



RENORBIO

Rede Nordeste de Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA POR
Gluconacetobacter xylinus E ELABORAÇÃO DE
FILMES COMESTÍVEIS**

Cynthia Gisele de Oliveira Coimbra

Recife

2016

Cynthia Gisele de Oliveira Coimbra

**PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA POR
Gluconacetobacter xylinus E ELABORAÇÃO DE
FILMES COMESTÍVEIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia RENORBIO, ponto focal da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutora.

Área de concentração: Biotecnologia Industrial

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Souto Maior

Co-orientador: Prof. Dr. Wagner Eduardo Silva

Recife

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Coimbra, Cynthia Gisele de Oliveira

**Produção de celulose bacteriana por *Gluconacetobacter xylinus* e elaboração de filmes comestíveis/ Cynthia Gisele de Oliveira
Coimbra– Recife: O Autor, 2015.**

137 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Ana Maria Souto Maior

Coorientador: Wagner Eduardo Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biotecnologia, 2015.

Inclui referências

- 1. Micro-organismos biotecnológicos 2. Celulose 3. Bactérias
I. Souto Maior, Ana Maria (orientadora) II. Silva, Wagner
Eduardo (coorientador) III. Título**

579

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-122

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA- RENORBIO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Tese de doutorado intitulada “**Produção de celulose bacteriana por *Gluconacetobacter xylinus* e elaboração de filmes comestíveis**”, apresentada por *Cynthia Gisele de Oliveira Coimbra* ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia RENORBIO, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia e obtendo a menção de aprovada.

Defendida publicamente em 28 de outubro de 2015 e aprovada pela banca examinadora:

Profª. Drª. Ana Maria Souto-Maior

Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Drª. Beate Saegesser Santos

Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Drª. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes

Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Drª. Márcia Silva do Nascimento

Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Irapuan de Oliveira Pinheiro

Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco

Dr. Wagner Eduardo Silva

Unidade Acadêmica do Cabo de Santo Agostinho da Universidade Federal Rural de Pernambuco

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO

PRESIDENTE DO CONSELHO DIRETOR

Dr. Carlos Afonso Nobre

Secretário de Políticas e Programas de Pesquisa e Desenvolvimento/Ministério de Ciências
Tecnologia e Inovação

COORDENADOR EXECUTIVO

Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) - Bahia

GERENTE ADMINISTRATIVO

Prof. Dr. Luciano Avallone Bueno

Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

COORDENADORA / VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA (PPGB-RENORBIO)

Prof^a. Dr^a. Maria Madalena Pessoa Guerra

Prof^a. Dr^a. Aurea Wischral

Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR DA UNIVERSIDADE FEDERAL E PERNAMBUCO

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

COORDENADORA DO PONTO FOCAL PERNAMBUCO- UFPE

Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir o alcance das metas traçadas ao longo da vida com saúde e força.

A minha mãe, Lúcia Coimbra e minha tia, Conceição Coimbra, exemplos de resignação perseverante e de fé, que nos deram a sustentação para ousar um doutorado por contar com esses portos seguros;

A Ary Feliciano, pelo companheirismo, apoio e compreensão;

À Professora Doutora Ana Maria Souto Maior, agradeço por ter, de longe, acompanhado nosso percurso de construção do conhecimento acadêmico, para nos aceitar como orientanda de doutoramento, depositando sua confiança e o melhor de seus conhecimentos que culminaram com um projeto a partir do qual foram realizados experimentos e análises hoje materializados em uma tese;

Ao Professor Doutor Wagner Eduardo Silva, co-orientador, a quem cabem os louros dos resultados, já que cedeu o micro-organismo para o desenvolvimento dos experimentos dessa tese;

À Professora Doutora Beate Saegesser Santos, por nos ter demonstrado por ações concretas o sentido pleno do compromisso de um Doutor na Academia – apontou-nos o livro a estudar, o caminho a seguir e nos concedeu a honra de ouvir os melhores ensinamentos. Facilitando o entendimento de conteúdos mais difíceis, comprometeu-se com nosso crescimento, com atenção e boa vontade sem esperar retorno;

Aos Doutores Glaucia Manoella de Souza Lima, Glícia Maria Torres Calazans, Ivanilda Ramos de Melo, Solange Maria Vasconcelos, Thiago Lucas de Abreu Lima, e Laís Guimarães Vieira, a quem devo muito por dedicarem o melhor de sua capacidade intelectual de crítica e de ensino, que foram integrados a nossa formação como pesquisadora;

Às técnicas do Departamento de Antibióticos, Mestres Marcela de Araújo Sobral e à bióloga Fátima Regina de Souza Medeiros Correia, sempre solícitas no processamento da liofilização das amostras;

Aos técnicos do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste e da Central Analítica, Fabia Lira, Gabrielle Vasconcelos, Cristal Ibanez, Gian, Conceição Pereira, Eliete Barros e Elaine Silva, por sua maturidade profissional em realizar com dedicação e qualidade as análises térmicas, por microscopia eletrônica e por difratometria de Raios X;

Aos alunos Juliette Borba, Monike Queiroz e Aline Lins por terem aceitado compor uma equipe realizando os processos pré-analíticos e pós-analíticos como parte de seu aprendizado, porém auxiliando a realização dessa tese;

Às Coordenações dos cursos de Farmácia da Faculdade da Associação Caruaruense de Ensino Superior e da Faculdade Pernambucana de Saúde, pela compreensão e flexibilização de horários em vários momentos de dedicação necessária ao desenvolvimento da tese;

À Fundação de Apoio à Ciência no estado de Pernambuco (FACEPE), pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo hipotético da rota metabólica para a biossíntese de celulose por <i>G. xylinus</i> .	31
Figura 2. Subunidades da celulose sintase	33
Figura 3. Hierarquia estrutural e sequência de eventos para formação das microfibrilas que constituem as membranas de celulose bacteriana	36
Figura 4. Representação esquemática do desenvolvimento das fibrilas de celulose ao longo do tempo de biossíntese	38
Figura 5. Estrutura de celulose I	39
Figura 6. Estrutura da celulose	41
Figura 7. Estruturas cristalinas e parâmetros de rede de sistema cristalino monoclinico e triclinico	41
Figura 8. Representação da direção de cinco cadeias paralelas aos planos (110) da célula unitária triclinica ($I\alpha$) e monoclinica ($I\beta$) de uma cadeia	42
Figura 9. Orientação relativa da célula unitária triclinica ($I\alpha$) de única cadeia com respeito à célula unitária monoclinica ($I\beta$) de duas cadeias	43
Figura 10. Modelo de empacotamento das cadeias de celulose projetadas no plano ab da célula unitária monoclinica	43
Figura 11. Padrões de ligações de hidrogênio para celulose I e celulose II	44
Figura 12. Posições rotacionais mais prováveis do grupo hidroxila do C-6	45
Figura 13. Estrutura proposta para o exopolissacarídeo acetana, proposta por Couso <i>et al.</i> (1987)	46
Figura 14. Relação entre velocidade de agitação em meios com diferentes fontes de carbono e concentração média de celulose produzida	65
Figura 15. Relação entre velocidade de agitação em meios com diferentes fontes de carbono e fator de conversão do substrato em celulose	67
Figura 16. Imagens de celulose bacteriana	68
Figura 17. Relação entre velocidade de agitação em meios com diferentes fontes de carbono e média do crescimento celular	69
Figura 18. Relação entre velocidade de agitação em meios com diferentes fontes de carbono e média dos fatores de conversão de substrato em biomassa	70
Figura 19. Relação entre velocidade de agitação em meios com diferentes fontes de carbono e média do consumo de substrato	73

Figura 20. Relação entre velocidade de agitação em meios com diferentes fontes de carbono e média da capacidade de retenção de água da celulose	75
Figura 21. Relação entre a velocidade de agitação, concentração de biomassa e de celulose com capacidade de retenção de água da celulose	76
Figura 22. Relação entre a velocidade de agitação, a fonte de carbono e os valores médios de acetana	78
Figura 23. Relação entre a velocidade de agitação, tipo de fonte de carbono e média dos fatores de conversão de substrato em acetana	80
Figura 24. Espectros FT-IR de amostras de celulose submetidas a diferentes tratamentos com NaOH e aquecimento em forno de micro-ondas	85
Figura 25. Imagens de MEV alto vácuo das superfícies das membranas purificadas com diferentes concentrações de NaOH e tempos de aquecimento	88
Figura 26. Imagens de MEV alto vácuo das superfícies das membranas purificadas a concentrações média e máxima de NaOH e tempos médio e máximo de aquecimento	89
Figura 27. Variação da espessura das fitas de celulose após tratamentos com diferentes concentrações de NaOH e tempos de aquecimento em micro-ondas	93
Figura 28. Diagrama de Pareto da variação da capacidade de retenção de água da membrana de celulose em concentrações de NaOH em função dos tempos de aquecimento em microondas	94
Figura 29. Influência da concentração de NaOH e do tempo de aquecimento em micro-ondas sobre a capacidade de retenção de água da celulose bacteriana.	95
Figura 30. Difractogramas das membranas de celulose submetidas a diferentes condições de purificação de acordo com planejamento fatorial 2 ² .	96
Figura 31. Influência da concentração de NaOH e do tempo de aquecimento ao micro-ondas sobre o índice de cristalinidade da celulose bacteriana	100
Figura 32. Variação e diagrama de Pareto da solubilidade dos filmes produzidos % (m/m) com as concentrações totais de poliálcoois e as proporções relativas de manitol e glicerol utilizadas (%)	104
Figura 33. Influência das concentrações de manitol e de glicerol sobre a solubilidade do filme	105
Figura 34. Representação gráfica da variação das concentrações totais de poliálcoois, das proporções relativas de manitol e glicerol utilizadas e taxa de intumescimento e gráfico de Pareto	107
Figura 35. Gráfico de superfície para o efeito de manitol e de glicerol sobre o intumescimento dos filmes produzidos	108

Figura 36. Representação gráfica da variação da espessura dos filmes com as concentrações totais de poliálcoois e proporções relativas de manitol e glicerol utilizadas em diagrama de Pareto	109
Figura 37. Gráfico de superfície 3D do efeito das concentrações de glicerol e manitol sobre a espessura dos filmes formados	110
Figura 38. Representação gráfica da variação das proporções relativas de manitol e glicerol utilizadas e da transparência do filme em diagrama de Pareto	112
Figura 39. Gráfico de superfície do efeito das concentrações (%) de glicerol e manitol sobre a transparência dos filmes formados	113
Figura 40. Variação da permeabilidade ao vapor de água dos filmes com as concentrações totais de poliálcoois e proporções relativas de manitol e glicerol em diagrama de Pareto	114
Figura 41. Gráfico de superfície que representa os efeitos das concentrações de manitol e de glicerol sobre a PVA dos filmes produzidos com celulose	115
Figura 42. Imagens de microscopia eletrônica dos filmes E5 a E9	118
Figura 43. Difractogramas dos filmes E5, E6, E7, E8 e E9, do manitol e da celulose bacteriana pura	124

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Áreas de conhecimento nas quais há evidência de aplicação de celulose bacteriana.....	22
Quadro 2. Condições utilizadas para a remoção de células das membranas de celulose bacteriana.....	50
Quadro 3. Agrupamento dos níveis testados para as variáveis Independentes que influenciaram significativamente as variáveis dependentes, segundo homogeneidade de médias (Turkey $\alpha=0,05$).....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial 2^2 incluindo os pontos central e axiais usados para investigar a influência da concentração de NaOH (g.L^{-1}) e do tempo de aquecimento em forno de micro-ondas sobre as características da celulose bacteriana tratada.	55
Tabela 2. Planejamento fatorial para avaliação da influência das concentrações dos polióis utilizadas na produção de filmes comestíveis de celulose.	56
Tabela 3. Índice de cristalinidade e percentual cristalino das membranas submetidas aos diferentes tratamentos de purificação com NaOH.	98
Tabela 4. Ângulo e intensidade dos picos de difração dos planos característicos da celulose I, distância entre os planos e o diâmetro médio dos cristalitos	120

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Solubilidade em água determinada pela adaptação do método de Gontard <i>et al.</i> (1996).....	57
Equação 2. Transparência dos filmes e barreira à luz.....	57
Equação 3. Taxa de intumescimento	58
Equação 4. Medida da permeabilidade dos filmes ao vapor de água.....	58
Equação 5. Determinação da capacidade de retenção de água da celulose	59
Equação 6. Determinação do fator de conversão de substrato em produto (celulose ou acetana).....	60
Equação 7. Determinação do fator de conversão do substrato em biomassa	61
Equação 8. Determinação do índice de cristalinidade da celulose.....	61
Equação 9. Determinação do grau de cristalinidade da celulose	61
Equação 10. Lei de Bragg para determinação da distância entre planos cristalinos.....	62
Equação 11. Determinação do diâmetro médio dos cristais perpendiculares aos planos de difração	62
Equação 12. Determinação do grau de cristalinidade dos filmes comestíveis, produzidos com celulose, glicerol e manitol	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATP.....	Adenosina trifosfato
CB.....	Celulose bacteriana
c-di-GMP.....	Ácido 3',5'-diguanílico cíclico ou diguanilato cíclico
CeS.....	Celulose sintase
CT.....	Complexos terminais
%Cr.....	Percentual cristalino
d (Scherrer).....	Diâmetro médio dos cristalitos
d_{hkl}	Distância entre as faces de um mesmo plano
FC.....	Fonte de carbono
FN.....	Fonte de nitrogênio
<i>G. xylinus</i>	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>
Glc.....	Glicose
GT.....	Glicosil-transferase
Hi.....	Hidrolisado de bagaço de cana de açúcar
IC.....	Índice de cristalinidade
NI	Nitrogênio inorgânico - $(NH_4)_2SO_4$
NO.....	Nitrogênio orgânico (extrato de levedura e peptona)
UDP-Glc.....	Uridina difosfato-glicose
ν	Deformação axial de ligações
δ	Deformação angular de ligações
CRA.....	Capacidade de retenção de água
$Y_{ps}(CB)$	Fator de conversão de substrato em celulose
$Y_{ps}Acetana$	Fator de conversão de substrato em acetana
Y_{xs}	Fator de conversão de substrato em células

RESUMO

Celulose bacteriana é um biopolímero flexível, constituído por fibras mais finas e poros menores do que as da celulose vegetal. Muitas aplicações já são conhecidas, mas ainda são necessárias informações para a viabilização de sua produção em escala industrial. Este trabalho visou contribuir com informações sobre os fatores que influenciam sua produção, sua purificação e elaboração de filmes para uso na área farmacêutica e de alimentos, bem como a interação entre estes fatores. Para tanto, foi realizado um estudo em três etapas: (1) avaliação da interação entre diversas fontes de carbono (glicose, xilose, sacarose, frutose e glicerol) e a velocidade de agitação sobre crescimento da biomassa, produção de celulose, sua capacidade de retenção de água e produção de acetana; (2) estudo do tratamento da celulose bacteriana, interrelacionando diferentes concentrações de NaOH e tempos de aquecimento em forno de micro-ondas de acordo com a efetividade de purificação e as possíveis alterações estruturais; e (3) aproveitamento da celulose produzida sob forma de filmes comestíveis, pela associação com glicerol e manitol em diferentes proporções e a caracterização dos mesmos. Identificou-se, para as condições investigadas, que: (1) a maior produção de celulose ($1,08 \pm 0,07 \text{gL}^{-1}$) é obtida com a mistura de glicose e frutose, em cultivo estático, já que a modificação das velocidades de agitação propiciou aumento da biomassa, sem acarretar maior produção de celulose e que as melhores condições de produção de celulose diferem das para a produção de acetana; (2) as condições ideais para a purificação da celulose é com NaOH a $0,85 \text{mol.L}^{-1}$ e 3,3 min de aquecimento em forno de micro-ondas; (3) o aquecimento a partir de 7 min promoveu modificações estruturais nos domínios cristalinos da celulose e que a partir de 12,5 min obtém-se a mercerização completa da celulose; e (4) é possível determinar as características finais dos filmes produzidos manipulando-se as proporções de manitol e glicerol associados à celulose, de forma a adequá-lo à aplicação desejada. Tais resultados conduziram à conclusão de que as determinações e os tratamentos realizados em cada uma das etapas possibilitou o conhecimento de que dois importantes fatores influenciam juntos a produção de celulose e de acetana por *Gluconacetobacter xylinus*, bem como a purificação de membranas de celulose e a elaboração de filmes comestíveis com possibilidade de manipulação de suas características para ampliação dos usos deste biopolímero na área farmacêutica.

Palavras-chave: Celulose bacteriana. *Gluconacetobacter xylinus*. Filmes comestíveis.

ABSTRACT

Bacterial cellulose is a polymer flexible, consisting of thinner fibers and smaller pores than plant cellulose. Many applications are already known, but are still necessary more information about its production for the viability of its production on an industrial scale. This work contributed with information on the factors that influence its production, purification and preparation of films for use in pharmaceuticals and food, as well as the interaction between these factors. To this end, this thesis was prepared in three stages: (1) evaluation of the interaction of various carbon sources (glucose, xylose, sucrose, fructose and glycerol), and the stirring rate on biomass growth, cellulose production, water retention capacity and acetan production; (2) study of the treatment of the bacterial cellulose, cross correlating different concentrations of NaOH and heating time in a microwave oven according to the effectiveness of the purification and the possible structural changes; and (3) use of the cellulose produced in the form of edible films, the combination with glycerol and mannitol in different proportions and characterization thereof. It was identified that (1) higher production of pulp ($1.08 \pm 0.07 \text{ gL}^{-1}$) was obtained with the mixture of glucose and fructose in static culture, since the modification of agitation rates resulted in an increase of the biomass, without causing larger cellulose production and the best cellulose producing conditions different from those for the production of acetan; (2) optimum conditions for the purification of cellulose is with NaOH 0.85 mol L^{-1} and 3.3 min of heating in microwave oven; (3) the heating from 7 min promoted structural modifications on cellulose crystalline domains and heating times from the 12.5 min cause complete mercerizing cellulose; and (4) it can determine the final characteristics of the films produced by manipulating the proportions of mannitol and glycerol associated with the cellulose in order to adjust it to the desired application. These results led to the conclusion that the proposed aims have been achieved, since the requirements and treatments carried out in each of steps allowed the understanding of how two important factors influencing together, the synthesis of cellulose and acetan by *Gluconacetobacter xylinus* and the purification of cellulose membranes and the preparation of edible films with the possibility of handling characteristics to expand the uses of this biopolymer in pharmaceutical area.

Keywords: bacterial cellulose. *Gluconacetobacter xylinus*. Edible films. Gross glycerin. Sugarcane bagasse.

SUMÁRIO

<i>Coimbra, Cynthia Gisele de Oliveira</i>	II
579 CDD (22.ED.) UFPE/CCB-2016-122	II
<u>1 INTRODUÇÃO</u>	18
<u>2 OBJETIVOS</u>	20
2.1 GERAL	20
2.2 ESPECÍFICOS	20
<u>3 REVISÃO DE LITERATURA</u>	21
3.1 CELULOSE BACTERIANA E SUAS APLICAÇÕES	21
3.2 PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA E ACETANA.....	25
<i>Micro-organismo</i>	25
<i>Condições de cultivo</i>	27
<i>Regulação da biossíntese de celulose por <u>Gluconacetobacter xylinus</u></i>	30
3.3 ESTRUTURAS QUÍMICA E CRISTALINA DA CELULOSE BACTERIANA	35
<i>Interações intra e intermoleculares da celulose</i>	38
3.4 PURIFICAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA	49
<u>4 MATERIAL E MÉTODOS</u>	52
4.1 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTURA	52
4.2 PRODUÇÃO DOS INÓCULOS	52
4.3 PRODUÇÃO DE CELULOSE	53
4.4 PURIFICAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO E TEMPOS DE AQUECIMENTO EM FORNO DE MICRO-ONDAS.....	54
4.5 PRODUÇÃO DE FILMES COMESTÍVEIS.....	55
4.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	58
<i>Determinações quantitativas</i>	59
<i>Análises estruturais</i>	61
4.7 TRATAMENTO DOS RESULTADOS.....	63

5	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</u>	64
5.1	PRODUÇÃO DE CELULOSE	64
	<i>Efeitos sobre a produção de celulose</i>	64
	<i>Efeitos sobre a produção de células</i>	68
	<i>Efeitos sobre o consumo do substrato</i>	71
	<i>Efeitos sobre a capacidade de retenção de água da celulose.....</i>	74
	<i>Efeitos sobre a produção de acetana.....</i>	78
	<i>Efeitos sobre o pH final do meio de produção.....</i>	80
5.2	PURIFICAÇÃO DAS MEMBRANAS DE CELULOSE	84
	<i>Efetividade da purificação.....</i>	84
	<i>Modificações estruturais nas membranas de celulose</i>	90
	<i>Efeito sobre a capacidade de retenção de água das membranas.....</i>	93
	<i>Efeito sobre a cristalinidade da celulose</i>	95
5.3	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES COMESTÍVEIS DE CELULOSE ASSOCIADA A MANITOL E GLICEROL.....	101
	<i>Características gerais dos filmes</i>	102
	<i>Solubilidade</i>	103
	<i>Intumescimento</i>	106
	<i>Espessura.....</i>	109
	<i>Transparência.....</i>	111
	<i>Permeabilidade.....</i>	113
	<i>Análise morfológica dos filmes por microscopia eletrônica de varredura.....</i>	116
	<i>Difratometria de raios-X.....</i>	120
6	<u>CONCLUSÕES</u>	127
7	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u>	128

1 INTRODUÇÃO

A película de celulose produzida por bactérias do gênero *Gluconacetobacter* já é estudada há quase 70 anos (KAUSHAU; WALKER, 1951). Tal polímero desperta muito interesse de pesquisadores nas diversas áreas da ciência por: (a) constituir um material insolúvel em água, apesar de sua elevada afinidade por esse solvente, (b) não ser produzida entrelaçada com outros polissacarídeos, como a celulose vegetal, (c) ser flexível e atóxica, (d) apresentar hidroxilas que possibilitam interações com diferentes grupos funcionais de outras moléculas e (e) apresentar porosidade reduzida e elevada resistência mecânica. Atualmente, é investigada por grupos de pesquisa de diferentes países, como Coréia, Japão, Estados Unidos, China, Dinamarca, Tailândia, Taiwan, Polônia, Turquia e Brasil. O elevado número de investigações reflete o potencial de uso da película de celulose e a necessidade de pesquisas visando a melhoria nas suas propriedades, bem como a diversificação de suas aplicações.

A celulose bacteriana apresenta muitas possibilidades de aplicação por possibilitar interações moleculares com muitos compostos. É possível adicionar substâncias que estabelecem com o polissacarídeo ligações mais fracas que a covalente, mas suficientes para modificar suas características, direcionando-as para novas finalidades. Apesar dos estudos realizados por muitos anos, ainda há muitos desafios a serem superados para que a celulose bacteriana possa ser produzida industrialmente e a um custo que permita a produção em larga escala. Sua purificação também é uma etapa ainda não adequadamente estabelecida, o que evidencia a necessidade de padronização, com base na sua efetividade e nos limites de severidade do tratamento impostos por modificações indesejadas do polímero.

Na Farmácia Industrial, pode-se estimar a aplicação em curativos celulósicos, matriz para imobilização de medicamentos, enzimas e micro-organismos. No ramo de Toxicologia, investiga-se a aplicação de filmes de celulose para redução do conteúdo orgânico de resíduos industriais pela degradação por enzimas ou células imobilizadas ou, simplesmente, por promover a ultrafiltração de resíduos. No ramo de Alimentos, a produção de

filmes para a conservação biológica dos mesmos tem sido investigada pela possibilidade de manter tais alimentos por mais tempo em condições ideais de consumo, reduzindo os prejuízos devido à sua perecibilidade (TAO *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2005; MIYAZAKI *et al.*, 2003).

Além de sintetizarem celulose, algumas cepas de *Gluconacetobacter xylinus* produzem também polissacarídeos hidrossolúveis e, dentre estes, pode-se destacar a acetana, a qual ainda carece de estudos sobre sua produção. As baixas concentrações obtidas desses polímeros podem justificar o reduzido número de investigações, contudo, muitas aplicações podem ser supostas para esse produto pela sua semelhança estrutural com a xantana, que já é produzida industrialmente.

Esta tese foi dedicada ao estudo da produção, da purificação e da aplicação da celulose na produção de filmes comestíveis para aplicação em alimentos ou como veículo ou proteção de drogas. O estudo da produção foi também acompanhado da quantificação de acetana, o que possibilitou uma discussão inédita sobre as condições de produção deste polissacarídeo.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar a síntese, a purificação de celulose bacteriana de *Gluconacetobacter xylinus* e a produção de filmes comestíveis visando aplicações farmacêuticas.

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a influência da fonte de carbono e da agitação sobre o crescimento, o consumo de substrato, as sínteses de acetana e de celulose por *Gluconacetobacter xylinus*, bem como sobre a capacidade de retenção de água da celulose produzida;
- Determinar as condições de purificação dos filmes bacterianos por tratamento alcalino em forno de micro-ondas e a influência das condições sobre a estrutura da celulose;
- Produzir e caracterizar filmes comestíveis utilizando as membranas de celulose produzidas pela associação com glicerol e manitol.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CELULOSE BACTERIANA E SUAS APLICAÇÕES

Celulose bacteriana é um homopolissacarídeo totalmente insolúvel em água, com elevado grau de pureza, resistência física e mecânica, flexibilidade e biocompatibilidade. Sua estrutura primária é similar à da celulose vegetal e de algas, porém difere na organização das cadeias e no diâmetro das microfibrilas, por ser aproximadamente dez vezes menor (SCHRAMM; HESTRIN, 1954; COOK; COLVIN, 1980, ROSS *et al.*, 1991).

Inúmeros são os estudos de aplicação da celulose bacteriana, na indústria têxtil, na indústria eletrônica, na purificação de efluentes, assim como em biomedicina incluindo a engenharia de tecidos e como curativos, conforme se observa no Quadro 1.

A diversidade de aplicações da membrana de celulose é ampliada por modificações estruturais, realizadas para adequar suas características às aplicações desejadas. Tais modificações podem ser realizadas pela substituição de seus grupos hidroxila por outros grupos substituintes, capazes de possibilitar sua interação com outros compostos ou superfícies; ou pela associação com compostos capazes de interagir com o polissacarídeo modificando-o estruturalmente, o qual pode ou não ser feito durante sua formação, como a celulose benzoilada produzida por Wang *et al.* (2008), a dietilenotriamina-celulose bacteriana produzida por Shen *et al.* (2009) e o filme composto por celulose bacteriana e *Aloe vera*, obtido por Saibuatong e Phisalaphong (2010).

A associação de celulose bacteriana com outros polissacarídeos como acetil glucomanana, xilana e pectina também foi estudada pelas mudanças estruturais e a possibilidade de reforço das propriedades mecânicas, biológicas e de hidrofiliabilidade do filme formado (TOKOH *et al.*, 1998; TOKOH *et al.*, 2002).

Wu *et al.* (2004) misturaram quitosana e solventes à celulose, obtendo membranas com diferentes proporções de cada um, do que decorreu o aumento da atividade antibacteriana proporcional à quantidade de quitosana na

membrana mista. Saibuatong e Phisalaphong (2010), por sua vez, obtiveram filmes mistos de celulose com até 30% (v/v) de gel de *Aloe vera* com características mecânicas, de higroscopicidade, cristalinidade e transmissão do vapor de água maiores que as da celulose sem *Aloe vera*.

Quadro 1. Áreas de conhecimento nas quais há evidência de aplicação de celulose bacteriana

ÁREA	APLICAÇÕES DA CELULOSE BACTERIANA
Cosméticos	Estabilizador de emulsões
Indústria têxtil	Roupas para esportes, tendas e equipamentos para acampamento
Mineração e refinaria	Esponjas para coleta de vazamento de óleo, material para absorção de toxinas
Tratamento de lixo	Reciclagem de minerais e óleos
Purificação de esgotos	Ultrafiltração de água para descontaminação
Equipamentos eletroeletrônicos	Diafragmas para microfones e estereofones Materiais optrônicos (telas de cristal líquido, suporte para OLED, equipamentos para controle luminoso)
Energia	Membrana sintetizada a partir de paládio como catalisador, para formar unidades internas (células) de baterias
Indústria de papel	Para obtenção de papéis especiais, em substituição à celulose de madeira
Indústria de alimentos	Celulose comestível (“nata de coco”) Filme para cobertura de alimentos, reduzindo a velocidade de amadurecimento e a possibilidade de crescimento de micro-organismos contaminantes Ação como crioprotetor para preservação de micro-organismos probióticos em alimentos
Saúde	Engenharia de tecidos – regeneração de órgão e tecido a partir de recrutamento do próprio paciente, em suporte plimérico de celulose, como regeneração de pele em feridas derivadas de perda tissular por queimaduras ou úlceras Constituição de próteses como implantes dentários Liberação controlada de antibióticos em sítio tissular
Laboratório	Imobilização de proteínas e de células, constituição de suporte para cromatografia, meios para cultura de tecidos

Fonte: Adaptado de Donini *et al.* (2010), Liu *et al.* (2005), Stoica-Guzun *et al.* (2007), Jagannath; Raju; Bauwa (2010), Valenta; Auner (2004); Barbanti, Zavaglia, Duek (2005).

O uso de celulose associada à liberação controlada de drogas pode ser exemplificada pelo trabalho realizado por Miyazaki *et al.* (2003). Esses autores associaram o [2-(dietilamino) etil] dextrana (EA), uma resina de troca iônica com propriedades hipolipemiantes, e o sulfato de dextrana (DS), empregado

como anticoagulante e hipolipemiante. Eles produziram microesferas com estas associações e, assim, possibilitaram aumento da liberação dessas drogas e da adesão às mucosas gástrica e intestinal, devido ao intumescimento da fase hidrofílica quando em contato com a água, controlada pela presença da fase hidrofóbica.

Para obtenção de menor força tênsil de membranas de celulose, compostas por metilcelulose ou hidróxi-propil celulose, com vistas à utilização como filmes comestíveis, Gennadios, Park e Weller (1993) adicionaram proteína de milho e glúten, comprovando tal alteração.

Os filmes e revestimentos são utilizados para a proteção de alimentos, mas também para veicular antioxidantes e aditivos alimentares, como antimicrobianos, vitaminas, saborizantes, nutrientes, corantes e ingredientes funcionais, interagindo com o alimento para a obtenção do resultado desejado. Essa interação objetiva melhorar a estabilidade, qualidade, segurança e funcionalidade dos alimentos (LABUZA, BREENE, 1989; BALDWIN, *et al.*, 1996).

Celulose bacteriana é um polissacarídeo insolúvel em água apesar da abundância de grupos hidroxila que suas cadeias apresenta porque a regularidade no espaçamento dos grupos hidroxilas, particularmente nas regiões cristalinas, facilitam a extensiva ligação de hidrogênio entre as cadeias, de forma que a disponibilidade dos grupos polares para a ligação com moléculas de água é praticamente nula. Este polissacarídeo também não é digerível, porque suas ligações apresentam configuração β , diferente do que as enzimas digestivas humanas são capazes de reconhecer, mas é biodegradável uma vez que outras espécies produtoras sintetizam enzimas capazes de degradá-la (FAKHOURI, 2006; BRYDSON, 1999).

A celulose apresenta excelentes propriedades mecânicas, ópticas, e sensoriais para o uso como filme comestível, porém apresenta alto coeficiente de permeabilidade ao vapor d'água além de não ser macia quando seca (FAKHOURI, 2006; BRYDSON, 1999) e sua opacidade pode comprometer a aparência do material a ser revestido, mas estas são características que

podem ser melhoradas pela associação com outros compostos, como os plastificantes.

Plastificantes são compostos de baixo peso molecular, de baixa volatilidade, higroscópicos e de natureza química similar à do polímero usado na constituição do filme ao qual são associados durante o preparo. Quando os plastificantes são adicionados à solução filmogênica, geralmente em concentração entre 10 % e 60 % (m/m) do filme, estabelecem interações com o polímero e assim modificam a organização molecular e aumentam o volume livre e o movimento das cadeias poliméricas. Essa associação promove alterações nas características do polímero como aumento de flexibilidade, extensibilidade e distensibilidade, seguidas por diminuição na resistência mecânica, temperatura de transição vítrea e barreira a gases e ao vapor de água, devido à sua higroscopicidade (BRYDSON, 1999; MALI *et al.*, 2007).

Quando os polímeros a serem plastificados são carboidratos como amido, ésteres de celulose, carragenanas, pectinas e alginato, que são muito hidrofílicos, a plastificação pode ser feita após a funcionalização do polímero, com inserção de outros grupos funcionais, como nitrato, éster, acetila e etila. Pode também ser feita pela associação com plastificantes capazes de realizar ligações de hidrogênio com estes polímeros, como os poliálcoois, que são moléculas orgânicas de baixo peso molecular, que possuem duas ou mais hidroxilas em sua estrutura. São exemplos dos poliálcoois que podem ser usados: glicerol, manitol, sorbitol, xilitol, lactitol, galactitol, isomaltol, maltitol, eritritol, butanodiol, hexanotriol, etilenoglicol, di, tri tetra, poli e propilenoglicol. Também podem ser utilizados monossacarídeos, etanolamina, uréia, trietanolamina, óleos vegetais, lecitina, aminoácidos e surfactantes, entre outros, que são biodegradáveis e/ou comestíveis (BRYDSON, 1999; VIEIRA *et al.*, 2011; AYDIN e ILBERG, 2016).

Dentre os polissacarídeos utilizados como matriz para a produção de filmes, o mais estudado é o amido, por causa da sua disponibilidade e facilidade de manuseio e, dentre os polióis mais estudados com as diferentes matrizes, tem-se o glicerol, pela sua eficiência de plastificação. Apesar de o número de hidroxilas dos plastificantes polióis influenciar o número de ligações de hidrogênio entre eles, a estrutura e a geometria moleculares dos

plastificantes podem influenciar a penetração dos mesmos entre as cadeias e reduzir as interações moleculares, limitando seu efeito plastificante (VIEIRA et al., 2011; AYDIN e ILBERG, 2016). Assim sendo, é importante o estudo de cada caso individualmente.

O manitol é um poliol de baixo peso molecular, mas apresenta reduzida higroscopicidade. Este poliol é um adoçante nutritivo e não tóxico encontrado naturalmente em algumas frutas e verduras, como abóboras e cogumelos. Por tais características é aplicado como aditivo alimentar e caracteriza-se por ser parcialmente metabolizado por seres humanos não induzindo a hiperglicemia, o que o torna útil em dietas para diabéticos (WISSELINK, *et al.*, 2002; SAHA, RACINE, 2011).

A produção de filmes com celulose bacteriana ainda não foi suficientemente explorada com plastificantes externos (que não resultam em ligações covalentes com o polímero), o que evidencia a importância do estudo dos filmes produzidos com estes polióis realizadas neste trabalho.

3.2 PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA E ACETANA

Micro-organismo

A celulose é sintetizada por bactérias dos gêneros *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* e *Sarcina*, bem como por gêneros da família Enterobacteriaceae. Admite-se que a síntese desse composto favorece a interação célula-célula e célula-superfície (ou bactéria-hospedeiro) nos diferentes ambientes em que tais micro-organismos são encontrados naturalmente. Ao possibilitar aderência do micro-organismo à superfície de frutas e vegetais, e especificamente à rizosfera de vegetais, a celulose lhes confere a colonização privilegiada de organismos superiores e de substratos (SCHRAMM; HESTRIN, 1954; COOK; COLVIN, 1980, ROSS *et al.*, 1991).

Dentre as espécies bacterianas produtoras de celulose, grande parte dos estudos emprega *Gluconacetobacter xylinus*, uma bactéria com forma bacilar (0,5 µm a 1,0 µm por 2,0 µm a 10,0 µm), Gram-negativa e aeróbia

estrita (KADERE *et al.*, 2008; TOMITA e KONDO, 2009). As células podem ser encontradas sozinhas, em pares, em cadeia ou em pequenos aglomerados. Quando móveis têm flagelos peritríquios e sintetizam celulose e acetana (GARRITY, 2005).

G. xylinus é utilizada como arquétipo para o estudo da biogênese da celulose por ser a maior produtora deste polissacarídeo. Dentre as cepas desta espécie utilizadas em diferentes estudos de produção de celulose, pode-se destacar a ATCC 23767 que, em 1886 foi denominada por Brown como *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*, nomenclatura confirmada no encontro da comissão judicial do ICSB, em 29 de março de 1973, que divulgou uma lista de nomes bacterianos aprovados, a serem publicados no Jornal Internacional de Bacteriologia Sistemática (SKERMAN *et al.*, 1980). Gillis *et al.* (1983) identificou tal cultura como sendo a mesma depositada por Bertrans, em 1933, na “National Collection of Industrial Bacteria” (NCIB) e solicitou que fosse recodificada para NCIB 4112, código até então utilizado para a bactéria do gênero *Acetobacter* correspondente à ATCC 23767, depositada na NCIB em 1949, inicialmente identificada como *Acetobacter xylinum* (RUKA *et al.*, 2012).

Yamada *et al.* (1997) descreveram as relações filogenéticas das bactérias de ácido acético dos gêneros *Gluconobacter* e *Acetobacter* com base na sequência parcial de bases do 16S rRNA e propuseram a elevação do subgênero *Gluconacetobacter* ao nível de gênero, com base nos resultados obtidos, além de fundamentar a transferência de cinco espécies de *Acetobacter* para o novo gênero *Gluconacetobacter*, incluindo *Acetobacter xylinum*, desde então denominada *Gluconacetobacter xylinus*.

Para *G. xylinus*, a síntese de celulose é fator que favorece o crescimento, pois a celulose sintetizada forma uma rede tridimensional na qual as células bacterianas ficam aprisionadas. A celulose apresenta densidade inferior à da fase aquosa, o que permite sua flutuação e a formação de membranas quando realizado o cultivo estático. Presume-se que a função desse polímero seja prover uma matriz que serve como instrumento de flutuação para as células, que se beneficiam do íntimo contato com a atmosfera estando ainda mergulhadas no meio de cultura. A celulose também favorece a colonização de substratos pela bactéria produtora, protegendo-a quando na

presença de contaminantes, uma vez que apresenta porosidade inferior ao diâmetro bacteriano e não permite que outros micro-organismos tenham acesso ao maior volume do meio. Pode ser utilizada como reserva de nutrientes e também protege as células dos efeitos da luz ultravioleta (SCHRAMM; HESTRIN, 1954; COOK; COLVIN, 1980, ROSS *et al.*, 1991).

Condições de cultivo

A produção de celulose está ligada ao crescimento celular e concorre com a oxidação de açúcares, porém não depende das vias de síntese das proteínas, de forma que as células em meios desprovidos de fontes de nitrogênio continuam produzindo celulose se houver disponibilidade adequada de carboidratos (ROSS *et al.*, 1991).

A possibilidade de aproveitamento de diferentes substâncias como fonte de carbono pelo micro-organismo amplia a variedade de matérias-primas que podem ser utilizadas na elaboração dos meios de cultivo para a produção de celulose e permite a redução de custos quando as mesmas são subprodutos de outras atividades industriais. Kesh e Sameshima (2005) avaliaram a produção de celulose por *G. xylinus* a partir de 18 fontes de carbono, dentre as quais apenas frutose, inositol e glicerol apresentaram rendimentos em celulose próximos aos da glicose, sendo o do glicerol 55% superior. Xilose, arabinose, manose e galactose, por exemplo, são carboidratos presentes nas hemiceluloses vegetais, além da glicose, o que as torna industrialmente interessantes, principalmente em regiões industriais que têm como subprodutos grandes quantidades de fibras vegetais, como o bagaço da cana de açúcar. Enquanto que o glicerol encontra-se com relativa abundância em subprodutos da produção de biodiesel, cuja produção e consumo vêm sendo incentivados nos últimos anos devido à necessidade de utilização combustíveis renováveis.

Além das fontes de carbono, outras substâncias influenciam o metabolismo de *G. xylinus* e, conseqüentemente, a produção de celulose. Naritomi *et al.* (1998 a,b), Ishihara *et al.* (2002) e Jung *et al.* (2010) verificaram

que, ao adicionarem lactato, etanol, metionina, ácido cítrico e ácido succínico promoveram melhores rendimentos em celulose.

A necessidade de oxigênio pela bactéria torna esse gás um componente limitante para o crescimento e um fator que influencia muito a atividade metabólica da bactéria. A produção de celulose por *G. xylinus* em cultivo estático mantém as células em suspensão, pois estas ficam retidas entre as microfibrilas da membrana formada na superfície do meio, permitindo um contato das células com maiores quantidades de oxigênio sem prejudicar a absorção de nutrientes, uma vez que se localizam na interface meio/ar. Kongruang (2008) verificou que a maioria das células de *G. xylinus* se localiza na parte superior da película em crescimento onde ocorre a produção de celulose em sentido descendente.

Keshk e Sameshima (2005) avaliaram a produção de celulose por *G. xylinus* em meio Hestrin-Schramm (HS) (30 mL de meio em Erlenmeyers com capacidade volumétrica para 100 mL) com 16 diferentes fontes de carbono (glicose, galactose, frutose, manose, ribose, ramnose, sorbose, xilose, lactose, trealose, sacarose, maltose, etanol, metanol, inositol e glicerol) e verificaram que a fonte de carbono influencia diferentemente o pH final da cultura, sendo glicose a que promoveu maior queda de pH. Porém não verificaram uma associação entre a queda de pH e a produção de celulose, e consideraram que a produção eficiente de celulose pela bactéria reside na sua capacidade de sintetizar glicose a partir de substratos de carbono diferentes e polimerizá-la formando celulose. Todos os experimentos foram realizados em frascos, em cultivo estático.

Yang *et al.* (1998) testaram a produção de celulose por esta cepa em meios de glicose, frutose, sacarose e misturas destas fontes de carbono. Os autores afirmaram que a bactéria a converte glicose em ácido glicurônico para, a partir deste, sintetiza a celulose. Quando a fonte de carbono foi frutose ou sacarose, os perfis de crescimento foram diferentes, pois a bactéria sintetizou celulose diretamente a partir do açúcar, não o convertendo a ácido, e mostrando uma produção associada ao crescimento. A produção de celulose em meio de sacarose foi muito menor do que em meio de frutose, embora a quantidade de células no meio de sacarose tenha sido ligeiramente maior.

Quando foi utilizada uma mistura de frutose e glicose no meio, *G. xylinus* converteu inicialmente glicose a ácido glucônico e só então procedeu à síntese de celulose, preferencialmente a partir da frutose no meio.

Ishihara *et al.* (2002) estudaram a eficiência de produção de celulose por dezessete cepas de *Acetobacter*, dentre as quais estava incluída *G. xylinus* ATCC 23767. Empregaram o mesmo meio de cultura (HS) utilizado por Keshk e Sameshima (2005) e explicaram a acidificação do meio e a produção de celulose utilizando xilose, pois observaram que a D-xilose é oxidada a ácido D-xilônico por *G. xylinus* e o xilonato se acumula no meio resultando em uma queda intensa do pH que é desfavorável à produção de celulose. No entanto, afirmaram que, se a D-xilose é transformada em seu isômero cetose, D-xilulose, metabólitos da sua utilização podem ser aproveitados para a síntese de celulose por *Acetobacter*, pois a maioria das bactérias utiliza a via xilose-isomerase para o metabolismo de d-xilose.

Castro *et al.* (2011) estudaram as características das membranas de celulose produzidas, utilizando-se caldo de cana (0,008% p/v de glicose, 0,066% p/v de frutose, 8,57% p/v de sacarose e 0,23% p/v de nitrogênio total) e suco de abacaxi (2,14% p/v de glicose, 2,4% p/v de frutose, 2,10% p/v de sacarose e 0,31% p/v nitrogênio total) sem adição complementar de fontes de carbono ou nitrogênio, uma vez que ambos os sucos já continham concentrações equivalentes às dos meios comumente utilizados. Verificaram que a produção de celulose em ambos os sucos foi maior que a em meio HS e que as microfibrilas da celulose produzida nas três condições não apresentaram diferenças estruturais significativas, o que considerou favorecer o uso desses produtos agroindustriais na produção de CB. Todos os experimentos foram realizados em frascos, em cultivo estático.

Yang *et al.* (1998) misturaram glicose e frutose e verificaram que a quantidade de celulose produzida por *G. xylinus* BCR5 em meios com glicose e frutose (3,82 g.L⁻¹ na proporção de 1:3) foram maiores do que em meios com qualquer um dos açúcares sozinho ou a mistura de glicose e sacarose. Essa informação chama atenção para o fato de a bactéria direcionar a glicose consumida para a síntese de ácido glucônico e não para a obtenção de celulose, pois esta foi preferencialmente produzida a partir de frutose e não do

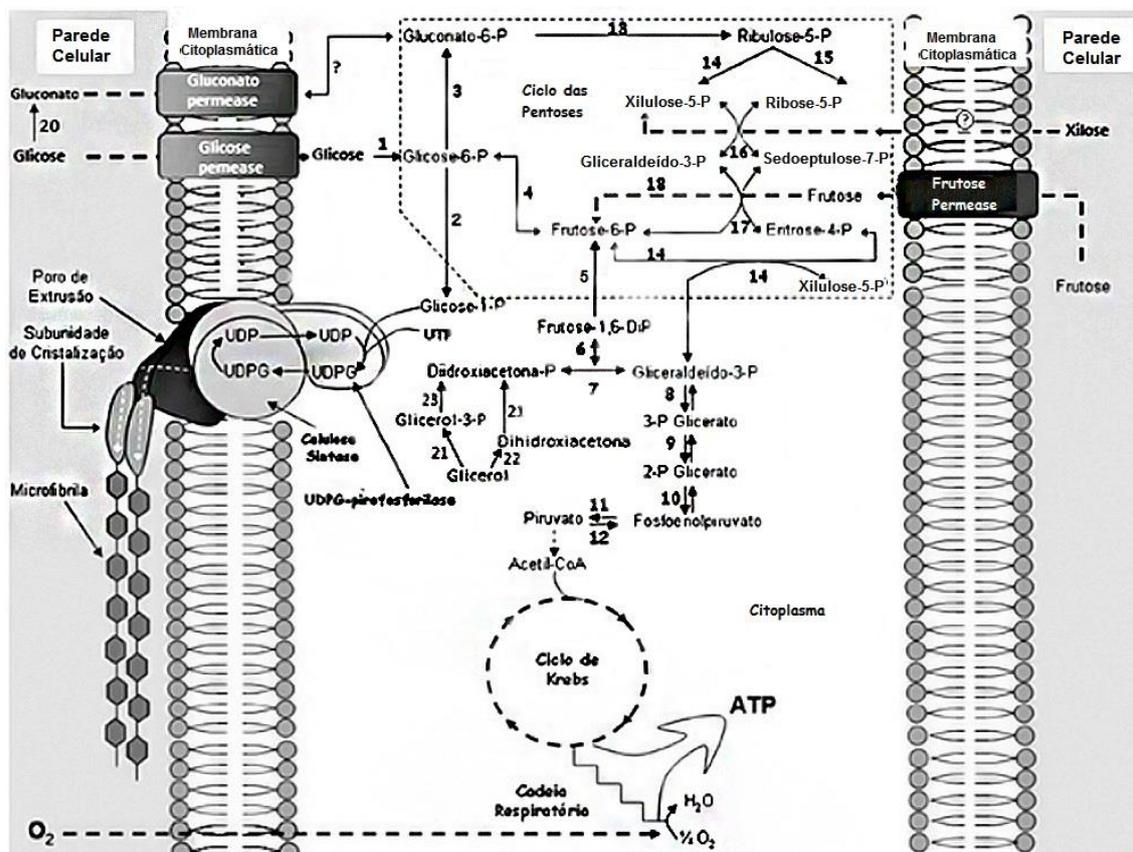
ácido produzido. Tal estudo foi realizado sob agitação em frasco (150 rpm) e em fermentador (500 rpm e 1000 rpm), e o aparecimento de cepas mutantes de *G. xylinus* não produtoras de celulose (*cel*⁻) foi monitorado e relacionado com a queda na produção de celulose em cultivo. As células mutantes *cel*⁻ de *G. xylinus* BCR5 apareceram quando a velocidade de agitação foi maior que 200 rpm e a fração de volume ($V_{\text{meio}}/V_{\text{frasco}}$) foi superior a 0,2.

Todos estes trabalhos dedicaram-se ao estudo da produção de celulose utilizando como única variável a fonte de carbono ou a matéria-prima utilizada na composição do meio, fixando a velocidade de agitação. Nota-se, portanto, a necessidade de estudos que esclareçam a influência demais de um fator sobre a produção de celulose e sua interação.

Regulação da biossíntese de celulose por Gluconacetobacter xylinus

Gluconacetobacter xylinus é capaz de utilizar vários substratos como fonte de carbono, por ser capaz de usar o ciclo das pentoses e o ciclo do citrato. O fluxo metabólico para as fontes de carbono de *G. xylinus* foi proposto por Ross *et al.*, em 1991, e é ainda utilizado como referência para o entendimento do comportamento da bactéria em meios contendo diferentes fontes de carbono (ZHONG *et al.*, 2013) (Figura 1).

Figura 1. Modelo hipotético da rota metabólica para a biossíntese de celulose por *G. xylinus*.



Fonte: adaptado de Donini et al (2010) e Ross (1991)

Legenda: Glicocinase ATP (1); Fosfoglicomutase (2); Glicose 6-fosfato desidrogenase (3); Fosfoglicoisomerase (4); Frutoquinase ATP (5); Aldolase (6); Triose fosfato isomerase (7); Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (8); Fosfogliceratomutase (9); Enolase (10); Piruvatoquinase (11); Piruvato difosfato diquinase (12); 6-fosfogliconato desidrogenase (13); Fosforribulose epimerase (14); Fosforribulose isomerase (15); Transacetolase (16); Transaldolase (17); Frutoquinase (18); Piruvato desidrogenase (19); glicose oxidase (20); glicerol-dihidroxiacetona quinase (ou glicerol quinase) (21); glicerol oxidase (22); glicerol-Pi desidrogenase (23).

A celulose tem a uridina-difosfato-glicose (UDP-glicose) como precursor imediato e é formada a partir de um “pool” metabólico de hexoses-fosfato, sustentado diretamente pela fosforilação de hexoses exógenas e, indiretamente, via ciclo das pentoses, e pela via gliconeogênica, que permite produção de celulose a partir de substratos diferentes da glicose, como outras hexoses, hexanoatos, compostos com três carbonos (como piruvato, glicerol e diidroxiacetona) e ácidos dicarboxílicos de quatro carbonos, do ciclo do citrato. Através do ciclo das pentoses, os açúcares e o gluconato são convertidos em glicose-6P, que é convertida a glicose-1P pela fosfoglicomutase, para só então

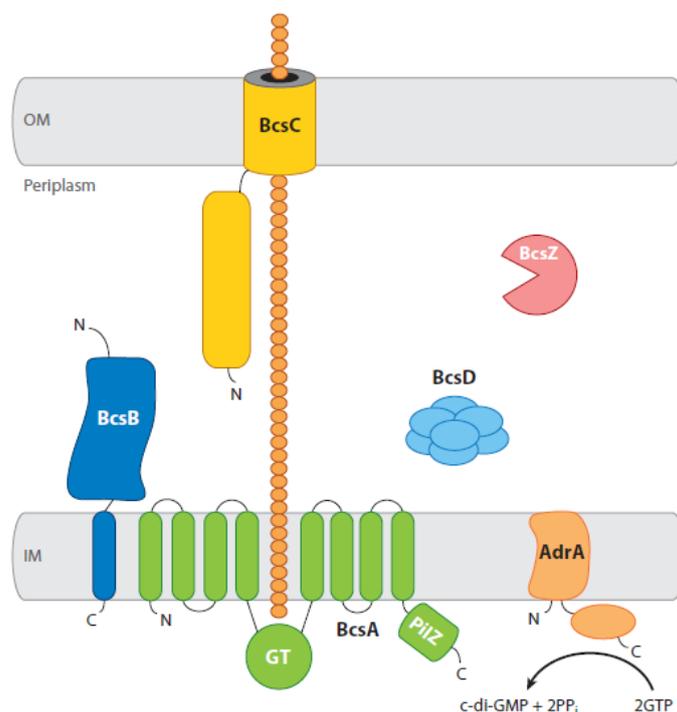
ser utilizada na biossíntese da celulose. O glicerol também entra no ciclo das pentoses após ser convertido em diidroxiacetona-P e, em seguida, frutose-1,6-diP.

A conversão de hexoses-fosfato em celulose é direta, uma vez que não inclui clivagem intermediária do esqueleto carbônico da hexose. O fluxo de carbono por hexoses-fosfato (via ciclo das pentoses) parece ser regulado por uma das duas glicose-6-P desidrogenases, operantes na bactéria, que é inibida por adenosina trifosfato (ATP) (ROSS *et al.*, 1991).

A síntese de celulose bacteriana ocorre por ação de complexos celulose sintase (CeS) integrais e glicosiltransferases (GTs). A GT transfere o grupamento glicosil da UDP-glicose (UDP-Glc) citosólica para a glucana β -1,4 por meio de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (SN₂), catalisada pela CeS, também conhecida como glicosil transferase (GT) inversora, por causa da inversão da configuração α do C1 da glicose ligado à UDP, à configuração β , quando o mesmo está ligado ao polímero de celulose (McNAMARA, 2015).

A biossíntese da celulose em *G. xylinus* é subordinada a vários mecanismos de controle do complexo sintetizante de celulose, o qual atravessa as membranas citoplasmática e externa e é composto por quatro subunidades. A celulose sintase bacteriana A (*bacterial cellulose syntase A* - BcsA) tem oito a 10 domínios transmembranares, cuja sequência é constituída de 723 a 888 aminoácidos, e é a mais conservada de todas as espécies. A proteína ligante de ácido 3',5'-diguanílico cíclico (c-di-GMP), denominada BcsB, é a menos conservada. As subunidades BcsC e BcsD ainda não tiveram suas funções determinadas, porém foi proposto que a BcsC funcione como a proteína que forma o poro através do qual a celulose é secretada, enquanto a BcsD parece estar envolvida no controle do processo de cristalização das nanofibras de celulose (RÖMLING, 2002; SCHMID *et al.*, 2015) (Figura 2).

Figura 2. Subunidades da celulose sintase



Fonte: McNamara (2015)

Legenda: IM- membrana interna; OM- membrana externa

A BcsA é considerada a subunidade catalítica da glicose pela sua homologia com outras glicosiltransferases e também por ser a única a se ligar ao substrato UDP-glicose. O seu mecanismo envolve a inversão da configuração do carbono anomérico do açúcar doador de α para β e gera UDP como grupo de saída, que também é estabilizado pela coordenação com resíduos de glutamina e arginida do motivo QxxRW da enzima, bem como os de treonina e lisina do motivo FxVTxK do sítio ativo da BcsA (SAXENA e Brown Jr, 2001; RÖMLING, 2002; McNAMARA, 2015).

O polímero crescente interage com a proteína por meio de forças de van der Waals entre as faces dos anéis dos açúcares e os aminoácidos aromáticos. São interações CH- π (entre regiões hidrofóbicas das moléculas orgânicas) através das quais as proteínas parecem reconhecer a estrutura secundária de polissacarídeos, enquanto as interações hidrofílicas com as hidroxilas dos açúcares conferem especificidade à enzima, além de apresentarem energia líquida (ou variação de energia livre) reduzida, o que compensa os custos energéticos do movimento do polissacarídeo. As interações proteína-celulose

são dinâmicas, para que as cadeias de glucanas deslizem através dos poros ou fissuras estreitas. A CeS alonga e move a celulose por uma molécula de glicose após cada rodada de catálise, em que a unidade de glicose recentemente adicionada é posicionada para se tornar o acceptor na reação subsequente, acoplando eficientemente a translocação e a síntese do polímero. Este, por sua vez, não retorna ao citosol e não é liberado prematuramente para o espaço extracelular devido à forte interação com o sítio ligante do acceptor (polímero em formação) na entrada do canal, através de ligações de hidrogênio (McNAMARA, 2015).

A BcsA é ativada pelo c-di-GMP citosólico. Este último não aumenta a velocidade de reação, mas sim o número de unidades de BcsA ativas no meio. O sítio ativo da BcsA é ocluído pela interação com o resíduo de arginina do domínio citosólico da enzima, chamado PilZ. Na presença do c-di-GMP, o resíduo de arginina gira para fora do sítio ativo para coordenar o c-di-GMP liberando o sítio, permitindo então a ligação com UDP-Glc (McNAMARA, 2015; SCHMID *et al.*, 2015).

A BcsB, por sua vez, localiza-se no periplasma; ancorada à membrana interna por uma hélice transmembranar C-terminal. É a proteína ligante de c-di-GMP que a ativa alostericamente através de uma ligação reversível, modulada pela concentração intracelular de potássio, que ocorre em uma proporção consideravelmente maior do que com a BcsA. Estima-se que esta interação prévia com a BcsB ocorra para direcionar c-di-GMP para a celulose sintase (RÖMLING, 2002).

A concentração de c-di-GMP livre é regulada pelas ações opostas de duas enzimas: a diguanilato ciclase (DGC), que cicla duas moléculas de guanidina trifosfato (GTP) com a liberação de duas moléculas de pirofosfato inorgânico (PPi) e uma de c-di-GMP, aumentando sua concentração; e a fosfodiesterase A (PDEA), que degrada o c-di-GMP a 5'-fosfoguanilil-(3'→5')-guanosine (pGpG) inativo.

G. xylinus contém três operons distintos com um par PDEA/DGC. Os operons contribuem, em diferentes níveis, com a rotatividade do c-di-GMP. Nas extremidades N-terminais de DGC e PDEA, há domínios sensoriais de sinais ambientais. A atividade de PDEA é regulada pelo oxigênio percebido pelo

domínio PAS, e a DGC abriga um domínio PAS que percebe o estado redox da célula (RÖMLING, 2002). DGC e PDEA são proteínas homólogas com domínios em comum (GGDEF ou DUF1 e EAL ou DUF2). O domínio GGDEF está comprovadamente relacionado com a produção de c-di-GMP e a síntese da celulose; enquanto que a função do domínio EAL permanece desconhecida (RÖMLING, 2002).

A forte relação entre a aeração do meio e a produção de celulose, bem como o aparecimento de mutantes *cel*, relatados por Yang *et al.* (1998) com *G. xylinus* provavelmente pode ser explicada pela relação entre as enzimas envolvidas na regulação de c-di-GMP e a disponibilidade de oxigênio no meio, e também pela mudança do potencial de óxido-redução dentro da célula. A agitação do meio sem aeração possivelmente influencia a produção de celulose, uma vez que favorece a transferência de massa e também a troca gasosa entre a fase líquida e a atmosfera. Como *G. xylinus* é aeróbia estrita, e a concentração de oxigênio no meio, bem como seu potencial redox, influenciam a disponibilidade do c-di-GMP e, conseqüentemente, a produção de celulose, a agitação do meio sem aeração pode evitar quedas consideráveis na concentração de oxigênio capazes de inibir o crescimento da bactéria e, conseqüentemente, a produção de celulose, além de não favorecer o aparecimento de mutantes *cel* por não elevar demasiadamente a concentração de oxigênio no meio.

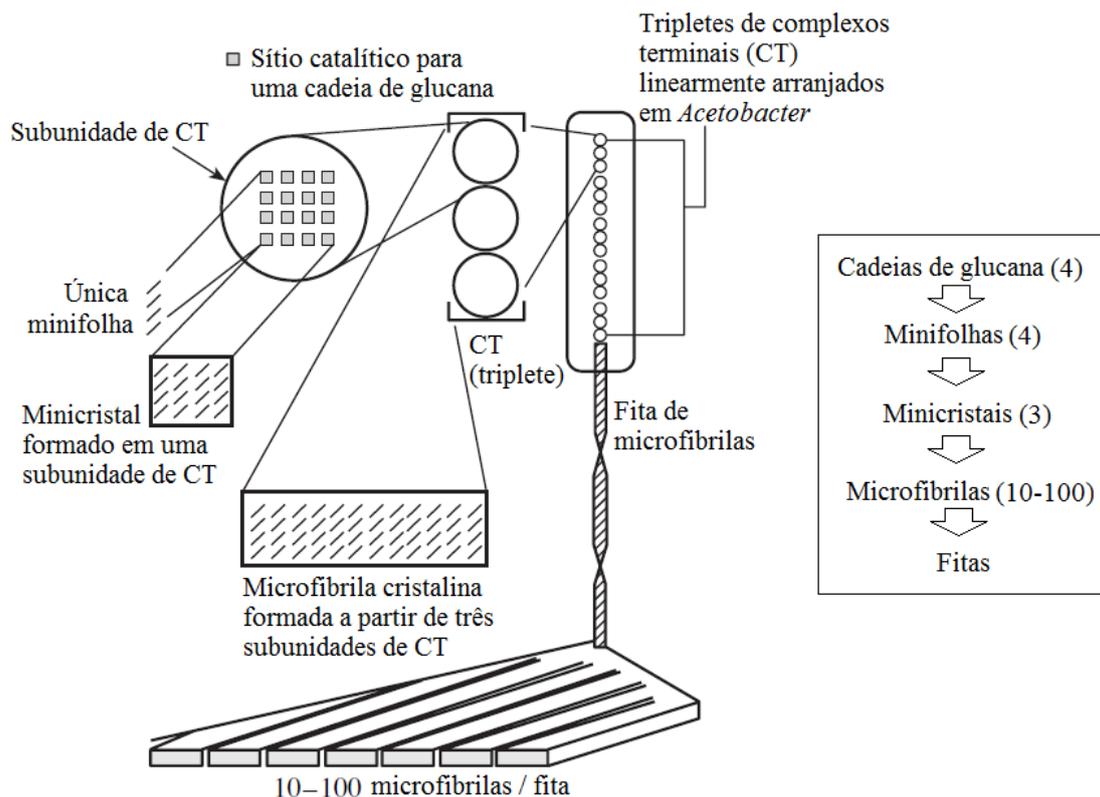
3.3 ESTRUTURAS QUÍMICA E CRISTALINA DA CELULOSE BACTERIANA

O processo de biossíntese da celulose bacteriana é altamente ordenado e estruturado e consiste em uma série intrincada de eventos que ocorrem para gerar uma estrutura cristalina submicroscópica e termodinamicamente estável. De acordo com Brown (1996), os sítios catalíticos polimerizam cadeias paralelas de glucana, próximas o suficiente para favorecer a associação das moléculas, que se cristalizam em alomorfos metaestáveis de celulose nativa. Esta síntese é simultânea. O primeiro estágio é a formação de uma minifolha

por meio de ligações de Van der Waals, seguida por uma laminação dessas minifolhas, para formar uma microfibrila cristalina.

O tamanho e a forma microfibrilar parecem ser determinados por um complexo enzimático multimérico denominado de complexo terminal (TC), que se localiza na membrana plasmática. O complexo inteiro se move na membrana plasmática fluida como resultado das reações de polimerização e cristalização. Todos os estágios são coordenados sob uma escala temporal/espacial e estão sob o controle genético do micro-organismo. A geometria e a sequência de eventos que ocorrem para a formação estrutural de um filme de celulose bacteriana sugeridas por Brown (2006), bem como a hierarquia estrutural, são mostrados na Figura 3.

Figura 3. Hierarquia estrutural e sequência de eventos para formação das microfibrilas que constituem as membranas de celulose bacteriana



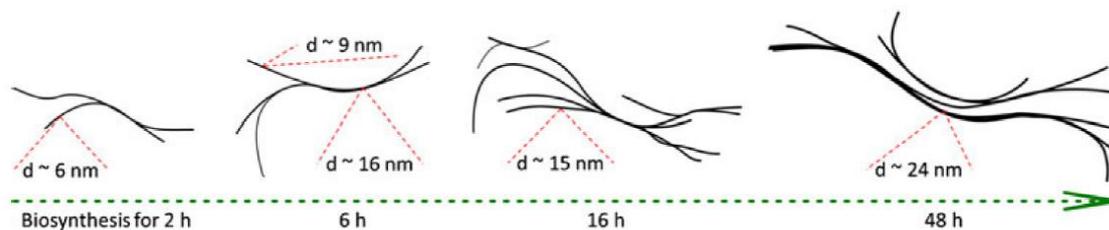
Fonte: Esquema adaptado de Brown (1996)
 Legenda: CT= complexos terminais

Os complexos enzimáticos nas células bacterianas são paralelos, organizados linearmente e agrupados em tripletes. Eles são próximos o suficiente para que as cadeias de glucana interajam entre si de forma adjacente à medida que são sintetizadas, por suas hidroxilas disponíveis. Cada complexo terminal é constituído por 16 polimerases alinhadas quatro a quatro, de forma que as cadeias de glucana, sintetizadas a cada quatro polimerases alinhadas, interagem entre si formando minifolhas, que se agrupam por meio de ligações de hidrogênio formando um minicristal, de forma que cada subunidade de complexos terminais sintetiza um minicristal. Cada triplete de complexos terminais, portanto, forma três minicristais os quais, unidos, formam uma microfibrila. As microfibrilas formadas em paralelo formam uma fita, cuja largura depende, portanto, do número de tripletes alinhados na célula, que variam de 10 a 100 (BROWN, 1996; KLECHKOVSKAYA *et al.*, 2003).

Parte das fitas de celulose mostra-se retorcida. Alguns autores atribuem o fato ao movimento translacional da bactéria durante a síntese do polímero e outros, às condições do meio (BROWN, 1996; KLECHKOVSKAYA *et al.*, 2003). A secreção das nanofibras de celulose e as fortes interações entre as mesmas estão relacionadas à velocidade de movimentação da bactéria que, por sua vez, também é influenciada pela composição do meio de cultura (TOMITA e KONDO, 2009). Zhang (2013) verificou que as torções ocorrem durante a biossíntese da celulose, em intervalos inferiores a 2,3 μm , sempre antes dos pontos de junção de uma fita com a outra, e que a torção das fitas sempre se dá para o lado direito, o que tem sido atribuído ao efeito direcional do meio e provavelmente leva à formação de feixes estruturalmente mais estáveis.

As fitas são formadas nas primeiras 2 h de incubação e têm em média $5,8 \pm 0,7$ nm de diâmetro, interagindo para formar feixes. A cristalização da celulose é concluída com a formação de feixes de fitas de aproximadamente $24,1 \pm 0,5$ nm de diâmetro, em 48 h após o início da síntese das cadeias (ZHANG, 2013). Este autor esquematizou a junção das fitas de celulose com seus diâmetros médios, para a formação da malha polimérica (Figura 4).

Figura 4. Representação esquemática do desenvolvimento das fibrilas de celulose ao longo do tempo de biossíntese



Fonte: Zhang (2013)

Legenda: d~ = distância aproximada; nm = nanômetros; h = horas

O grau de cristalinidade da celulose é influenciado pela composição do meio. Keshk e Sameshima (2005) verificaram diferenças estruturais na celulose produzida em meio HS com diferentes fontes de carbono, refletidas no índice de cristalinidade, no grau de emaranhamento das microfibrilas, na capacidade de retenção de água e na viscosidade quando compararam a celulose produzida em meio com hexoses com outras fontes de carbono.

Shezad *et al.* (2010) compararam a produção e as características da celulose batelada e batelada alimentada em meio de resíduos de caldo de fermentação de cerveja e em meio sintético. Os autores verificaram que a cristalinidade de celulose foi maior quando sintetizada em batelada e que aquela produzida em meio sintético superou a cristalinidade da sintetizada em meio de resíduo de caldo de fermentação de cerveja.

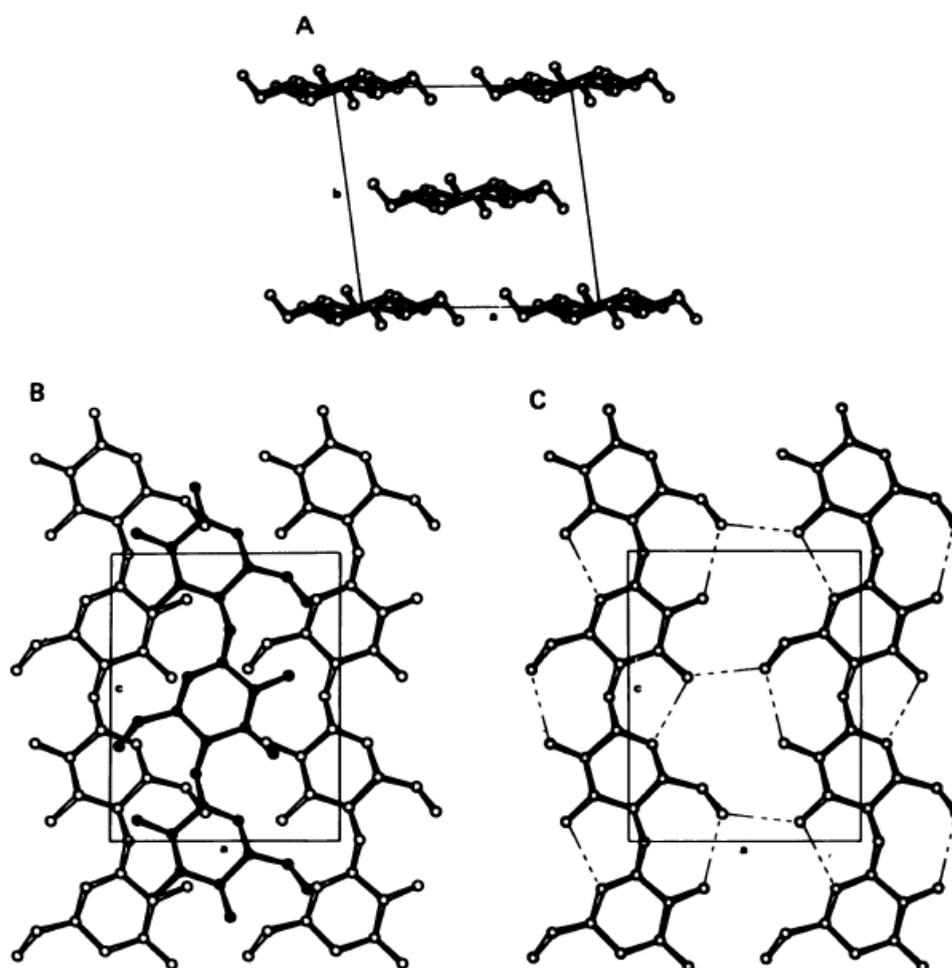
Interações intra e intermoleculares da celulose

O carbono anomérico C1 da celulose está na configuração beta e cada unidade de glicose é girada em aproximadamente 180° em relação a suas vizinhas, formando assim uma unidade repetida do dissacarídeo celobiose. Essa estrutura apresenta uma simetria interna de parafuso duplo, característica das glucanas β -1,4 (GAUTAM *et al.*, 2010).

Cada resíduo piranósico apresenta hidroxilas livres nos carbonos C2, C3 e C6, as quais interagem entre si e com o oxigênio do anel piranósico, para formarem os sistemas ordenados de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares que originam os diferentes tipos de estruturas

supramoleculares semicristalinas. As hidroxilas dos carbonos C3 e C6 de cada unidade de glicose doam uma ligação de hidrogênio para o oxigênio do anel e à hidroxila do C2, respectivamente, da unidade de glicose ligada ao seu C4. O oxigênio do anel e a hidroxila do C2 de cada unidade de glicose, por sua vez, aceitam ligações de hidrogênio das hidroxilas dos carbonos C3 e C6 da unidade de glicose ligada ao seu carbono C1 (Figura 5).

Figura 5. Estrutura de celulose I



Fonte: Ross *et al.* (1991)

Legenda: (A) observação ao longo das cadeias com visualização das prováveis interações intermoleculares, (B) projeção de cadeias paralelas em níveis diferentes que permite a visualização da superposição entre as mesmas; (C) representação das ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares

As ligações intramoleculares são muito importantes no que diz respeito à conformação da cadeia simples e a sua rigidez, pois essa rede de interações

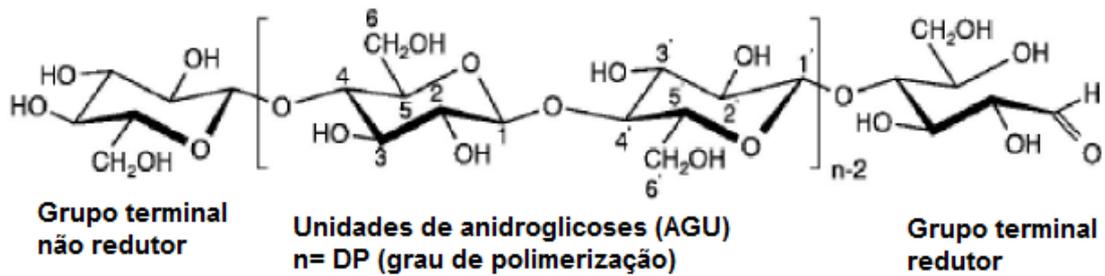
estabiliza a orientação coplanar dos anéis glicopiranosícos individuais (ROSS *et al.*, 1991; GAUTAM *et al.*, 2010; McNAMARA, 2015).

A celulose tem características hidrofílica e hidrofóbica. Como cada glicose contém hidroxilas equatoriais, que apontam radialmente em frente, a partir da face do anel piranosíco, e o polímero tem suas hidroxilas equatoriais formando suas bordas, a celulose interage muito bem com as moléculas de água. Por sua característica anfipática, autoassocia-se por interações de van der Waals entre os anéis piranosícos, e torna-se insolúvel em água quando o grau de polimerização passa de seis a oito (McNAMARA, 2015).

Quanto à estrutura física, a celulose bacteriana se caracteriza como material semicristalino com regiões de elevada cristalinidade, que medem aproximadamente 200 unidades de comprimento, separadas por regiões amorfas. São conhecidos seis polimorfos da celulose cristalina, porém os alomorfos I e II são os mais estudados. Esses alomorfos (mesma estrutura química, mas estruturas cristalinas diferentes) são encontrados na natureza, com frequências diferentes.

A celulose I, mais frequente, tem as cadeias de glucana exclusivamente paralelas. As cadeias de celulose são arranjadas de forma que os anéis piranosícos são paralelos ao plano bc do cristal, o que confere características distintas às duas faces, que expõem os anéis piranosícos em relação às outras faces. As ligações intramoleculares características desse alomorfo ocorrem entre o hidrogênio da hidroxila do C-3 (O-3-H) e o oxigênio do carbono 5 (O-5) (2,75 Å da unidade de anidroglicose vizinha) e entre o hidrogênio da hidroxila do C-2 (O-2-H) e o oxigênio do C-6 (2,87 Å). A celulose II apresenta cadeias antiparalelas. Esta, assim como a celulose não cristalina, é sintetizada provavelmente por subunidades isoladas como observado em reações *in vitro*, ou por mutantes cuja organização das subunidades catalíticas foi alterada. A celulose I tem extremidades redutoras, como pode ser verificado na Figura 6, o que não se verifica na celulose II. O alomorfo I é a forma da celulose termodinamicamente metaestável e pode ser convertida em celulose II que é mais estável, enquanto o contrário não é possível (BROWN Jr., 1999; SAXENA E BROWN Jr, 2001; GAUTAM *et al.*, 2010).

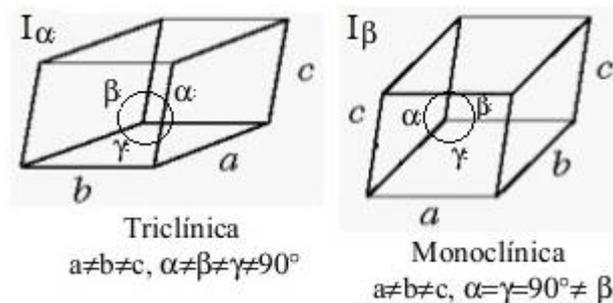
Figura 6. Estrutura da celulose



Fonte: Gautam *et al.*(2010)

São conhecidos também dois subalomorfos da celulose I: I_α e I_β , que foram descobertos e diferenciados por difratometria. A célula unitária da estrutura cristalina da celulose I_α é triclínica e a da celulose I_β é monoclínica e termodinamicamente mais estável (Figura 7).

Figura 7. Estruturas cristalinas e parâmetros de rede de sistema cristalino monoclínico e triclínico



Fonte: Adaptado de Souza Lima e Borsali (2004)

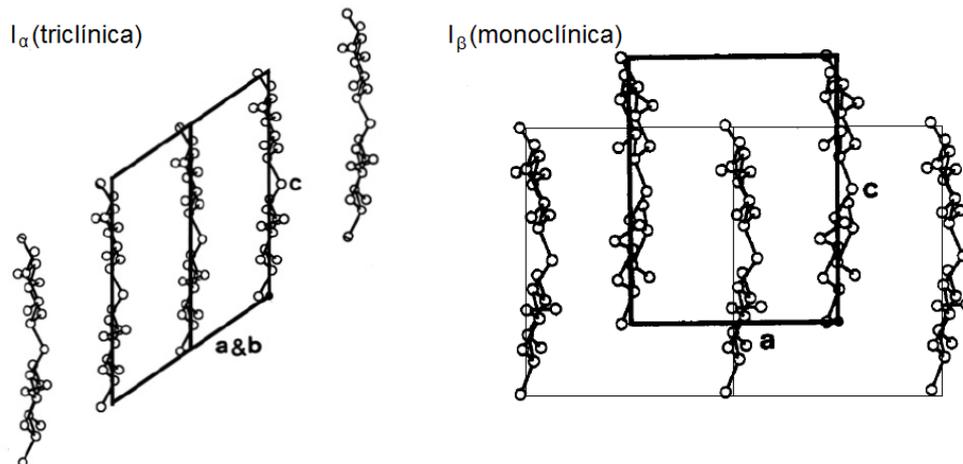
Legenda: a, b e c = comprimentos dos lados em cada um dos eixos (x, y e z); α , β e γ = ângulos da estrutura cristalina

Ambos os alomorfos coexistem em uma mesma microfibrila e estão em diferentes proporções nas celuloses dependendo de sua origem e do grau de empacotamento das cadeias durante a biosíntese. As condições de produção também influenciam a proporção I_α/I_β das diferentes origens, do que decorre essa proporção ser utilizada como forma de caracterização das celuloses nativas como “ricas em I_α ” (celulose de algas e bactérias) e “ricas em I_β ”

(celulose de algodão e ramie). Somente um grupo de organismos (o dos tunicatos) é capaz de sintetizar quase exclusivamente o subalomorfo I_β (BROWN Jr., 1999).

Sugiyama *et al.* (1991) esquematizaram a organização das cadeias para a formação dos subalormorfos I_α e I_β (Figura 8).

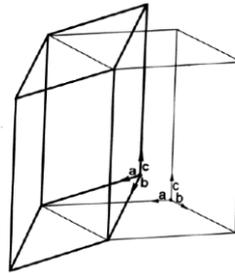
Figura 8. Representação da direção de cinco cadeias paralelas aos planos (110) da célula unitária triclinica (I_α) e monoclinica (I_β) de uma cadeia



Fonte: Sugiyama *et al.* (1991).

Sendo uma célula unitária de uma cadeia, isto requer que todas as cadeias sejam empacotadas em uma faixa paralela ao longo dos blocos cristalinos triclinicos. Na estrutura triclinica, a celobiose é a repetição cristalográfica independente, e não a glicose. Um estudo da geometria indica que as moléculas de celulose são organizadas em folhas ao longo do plano (100), onde as metades das celobioses estão no mesmo nível do eixo da cadeia. Sugiyama *et al.* (1991) esquematizaram também a maneira como ambos os alomorfos podem coexistir em uma mesma microfibrila (Figura 9).

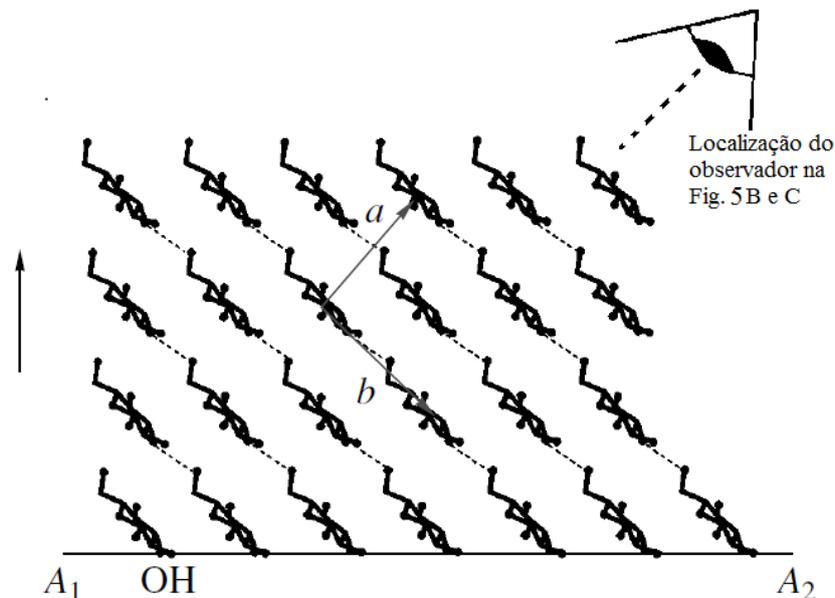
Figura 9. Orientação relativa da célula unitária triclinica ($I\alpha$) de única cadeia com respeito à célula unitária monoclinica ($I\beta$) de duas cadeias



Fonte: Sugiyama *et al.* (1991)

Klechkovskaya *et al.* (2003) sugeriram o modelo de empacotamento de cadeia representado sobre o plano ab da estrutura monoclinica ($I\beta$), com duas macrocadeias por célula unitária. Eles produziram celulose em meio sólido e verificaram que os domínios cristalinos têm a estrutura $I\beta$ orientada principalmente pelos planos $(1\bar{1}0)$ sobre a superfície do meio de cultura (linha A1-A2) (Figura 10). Os planos são orientados pelas hidroxilas primárias ao longo da superfície e criam uma rede de ligações de hidrogênio com o meio aquoso, que é preservada durante a purificação do filme gelatinoso e sua estocagem.

Figura 10. Modelo de empacotamento das cadeias de celulose projetadas no plano ab da célula unitária monoclinica



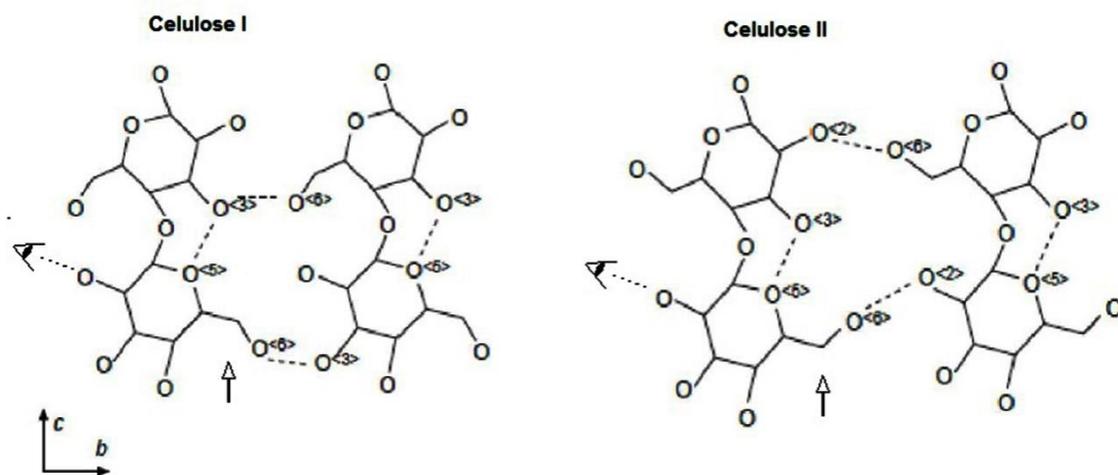
Fonte: Klechkovskaya *et al.* (2003).

Legenda: Orientação A1-A2 das fitas de microfibrila no plano da membrana de celulose. A seta indica a direção das minifolhas durante a biossíntese

A celulose II apresenta cadeias antiparalelas e geralmente é obtida após o processo de mercerização industrial, em que a celulose nativa é parcialmente solubilizada e se reorganiza em uma forma termodinamicamente mais estável após reprecipitação (ROSS *et al.*, 1991; BROWN Jr., 1999; GAUTAM *et al.*, 2010). Suas cadeias formam um ângulo de 30° a partir do plano ab. Suas ligações de hidrogênio intramoleculares são essencialmente as mesmas da celulose I, considerando a ligação entre O-3-H e O5' (2,69 Å), mas suas ligações de hidrogênio intermoleculares são consideravelmente mais complexas. A celulose II possui ligações intracadeias (OH)6-(O)2 nas cadeias das extremidades e (OH)6-(O)3 nas cadeias do centro.

As ligações intermoleculares são responsáveis pelo formato das folhas do polímero nativo. As ligações (OH)6 e (O)3 intercadeias na celulose I e (OH)6 e (O)2 na celulose II podem ser verificadas na representação da Figura 11.

Figura 11. Padrões de ligações de hidrogênio para celulose I e celulose II



Fonte: figura modificada de Gautam *et al.* (2010)

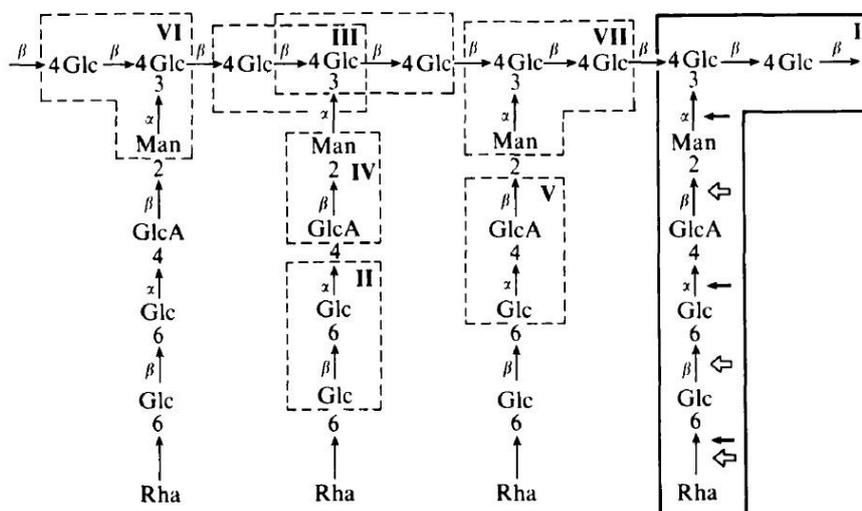
Legenda: a posição do observador indicada é a utilizada para a verificação das posições rotacionais ilustradas na Figura 12. As setas chamam atenção para a posição diferenciada da hidroxila do carbono 6 na celulose I e na celulose II.

As dimensões das ligações intercadeias e interfolhas nas celulosas I e II também são diferentes devido às ligações de hidrogênio que apresentam. A conformação da hidroxila do C-6 é essencial para o entendimento das

manose, ácido glicurônico e ramnose, na proporção molar de 3-4:1:1:1 e informaram sua estrutura, com base na elucidação dos resíduos formados pela degradação hidrolítica (Figura 13).

Considerando que a tradução dos nomes de polissacarídeos como “levan” e “dextran” para o português consistem no acréscimo da letra “a” ao final do nome, tal polissacarídeo será tratado neste texto como acetana, apesar de ainda não existir sua tradução oficial para a língua portuguesa.

Figura 13. Estrutura proposta para o exopolissacarídeo acetana, proposta por Couso et al. (1987)



Fonte: Couso et al. (1987)

Legenda: o oligossacarídeo destacado com linha sólida representa a unidade repetida do polissacarídeo. Os destacadaos com linha pontilhada (II e VII) são os produzidos pela hidrólise do polissacarídeo. Setas sólidas e vazadas representam ligações susceptíveis à degradação ácida e à acetólise, respectivamente.

Acetana apresenta características que possibilitam importantes interações químicas e físico-químicas quando em solução, como a provável variação da sua influência sobre a viscosidade do meio. Cada unidade repetida de acetana têm dois grupos O-acetil, doados por Acetil Co-A durante a biossíntese, que se localizam na posição 6 dos resíduos (1,3,4)Glc e (1,2)Man de cada ramificação e possibilitam interações químicas adicionais da molécula com outras capazes de reagir com este grupo funcional (JANSSON et al.,1993; SEMINO e DANKERT, 1993; OJINAKA et al., 1996).

A acetana se assemelha à xantana pela repetição de heptassacarídeos e pela constituição da cadeia principal. Por causa desta semelhança espera-se que apresente aplicações semelhantes, porém ainda não há métodos de produção desenvolvidos até então. Quando em solução, as cadeias laterais de acetana dobram-se para baixo no sentido da cadeia principal do polímero e o mesmo assume uma conformação helicoidal. Além disso, os dois açúcares mais externos das cadeias laterais apresentam maior mobilidade e a conformação em solução é termorreversível (JANSSON et al., 1993; SEMINO e DANKERT, 1993; OJINAKA et al., 1996). A possibilidade de mudança na conformação resulta uma mudança do volume efetivo da molécula dependendo da temperatura e, conseqüentemente, na viscosidade da solução e isto reflete as possibilidades de aplicação para o polissacarídeo como espessante, agente suspensor ou mesmo gelificante em produtos farmacêuticos ou alimentícios, dentre outras possibilidades.

Iannino et al. (1988) confirmaram a relação entre a produção dos oligossacarídeos e a biossíntese de acetana pela polimerização dos mesmos. Verificaram que nem todas as cepas de *Acetobacter xylinum* testadas eram capazes de produzir acetana, que as culturas mais velhas perdiam a capacidade de produção deste polissacarídeo e que as que produziam também sintetizavam os supracitados oligossacarídeos *in vitro*, destacando que a participação destes intermediários ligados a lipídeos (isoprenóis) torna o mecanismo de biossíntese consideravelmente diferente da celulose, apesar de ambos os polímeros serem estruturalmente relacionados. As cepas testadas neste estudo foram: NRRL B42; ATCC 10821; ATCC 23769; ATCC 10245; NCIB 8747 (sabidamente não produtora); RCGrl e NICHl, isoladas de placas de B42 e de RCGrl, respectivamente como colônias diferentes das originárias) dentre as quais apenas as cepas B42 e a RCGrl produziram acetana. A cepa BPR 2001 é usada como referência na produção de acetana e a cepa ATCC 23767 apresenta similaridade da sequência do rRNA 16S ser de 99,6 % com a da primeira (Ishida et al., 2002a; Ishida et al., 2002b; Ishida et al., 2002c; Bae et al., 2003; GARRITY, 2005), o que pode indicar que acetana é o principal

dentre os polissacarídeos solúveis possivelmente produzidos pela cepa ATCC 23767.

Para a produção deste polissacarídeo a bactéria sintetiza, inicialmente, as unidades de heptassacarídeos (X7) ligados a lipídeos (difosfatoprenóis) e, em uma etapa subsequente, reúne tais unidades formando acetana, que consistem em uma cadeia principal de β -1,4 glucana, com ramificações ancoradas na posição 3 de resíduos β -D-glicopiranosil alternados. As ramificações são constituídas de três ou quatro piranoses, contendo também manose, ácido glicurônico e ramnose como representado na Figura 13, que é secretado da célula para o meio (COUSO et al., 1982; COUSO et al., 1987; IANNINO et al., 1988).

A biossíntese de acetana depende da atividade de várias enzimas, dentre as quais podem ser destacadas a glicosiltransferase codificada pelo gene *aceQ* e a ramnosiltransferase codificada pelo gene *Acer* (Ishida et al., 2002b).

Ishida et al (2002a) bloquearam a produção de acetana através de uma mutação da linhagem de *G. xylinus* BPR2001 para avaliar o rendimento de celulose e observou que a linhagem mutada produzia celulose com menor rendimento do que a não transformada. Cultivaram então a linhagem mutante em meio contendo acetana e obtiveram rendimento em celulose equivalente ao com a linhagem BPR2001. Observaram que o meio com acetana era mais viscoso e o número de células livres era maior do que o meio sem o polissacarídeo, o que os levou a especular que a viscosidade do meio influencia a produção de celulose. O aumento da viscosidade do meio dificulta a difusão de oxigênio e nutrientes. Considerando que o papel ecológico da celulose para as células é mantê-las flutuando, na interface líquido-ar, o argumento de que a menor dispersão de oxigênio pode ter estimulado a produção de celulose faz sentido. Bae et al. (2003) também verificaram que a presença de acetana, assim como a adição de agar, além de não reduzir a produção de celulose por competição pelo substrato (UDP-glicose), favorecem a sua produção, por se tratarem de polissacarídeos solúveis que promovem o aumento da viscosidade e dispersam as células e os “pellets” no meio.

3.4 PURIFICAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA

Uma das principais etapas na produção de qualquer produto, e não difere para a celulose, é a sua purificação. A celulose bacteriana, quando retirada do meio de cultura carrega os componentes do meio de cultura, ácidos nucleicos e proteínas provenientes das células, além das células bacterianas aprisionadas em sua trama, o que lhe confere uma coloração amarelada (GEA *et al.*, 2011). Daí decorre que a purificação da celulose se destina essencialmente a remover todos os resíduos indesejáveis ligados à fibra de celulose e as células bacterianas produtoras do polímero, além de impurezas que ocorrem durante o processo de transformação das mesmas em compostos que são solúveis em solução alcalina. (GEA *et al.*, 2011). A remoção de células da membrana de celulose exige destruí-las por estarem firmemente aderidas à celulose.

A maioria dos processos encontrados na literatura envolvem tratamento com hidróxido de sódio (NaOH), porém há consideráveis divergências entre as condições de tempo e de temperatura utilizadas no processo como pode ser verificado no Quadro 2 (SUGANO; SHODA, 2004; WAN *et al.*, 2006; LIN *et al.*, 2009; SAKAIRI *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 1998; SETYAWATI *et al.*, 2007; SON *et al.*, 2003; NARITOMI *et al.*, 2002).

A eficácia de remoção de todas as células pelo tratamento com álcali pode ser questionada uma vez que os tempos e as temperaturas utilizadas variam consideravelmente e também pela inexistência de um trabalho dedicado ao estudo desta operação e as consequências estruturais na celulose até o presente momento. Quando se objetiva a utilização da membrana de celulose bacteriana em humanos, para fins alimentícios ou medicamentosos, resquícios de células bacterianas na membrana podem provocar reações ou intoxicações, o que requer padronização da etapa de purificação da membrana.

O tratamento da celulose visa à remoção de células, porém também pode resultar em modificações estruturais da celulose, uma vez que provoca sua mercerização, com conversão de celulose I em celulose II. As concentrações de NaOH usadas para esta transformação variam dependendo do tipo e da origem da celulose a ser tratada. Consideram-se nos estudos dos

efeitos do alcali sobre a estrutura da celulose condições brandas como a simples imersão da celulose, desde poucos minutos a 48 h (GEA *et al.*, 2011).

Quadro 2. Condições utilizadas para a remoção de células das membranas de celulose bacteriana

AUTORES	1° Etapa	2° Etapa	3° Etapa	4° Etapa
Sugano e Shoda (2004)	Centrifugação do caldo de cultura a 4.000 g por 20 min	Submersão em NaOH 0,1 N a 80°C por 20 min	Lavagem com H ₂ O mais de três vezes	Secagem a vácuo a 80°C por 8 h e pesagem
Goelzer <i>et al.</i> (2009)	Submersão em NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ por 24 h	Lavagem com água	Centrifugação (500 rpm por 15 min), e submersão em NaOH 0,1M por 24 h	Lavagem com H ₂ O, liofilização e manutenção em dessecador a vácuo a 40°C.
Wan <i>et al.</i> (2006)	Ajuste de pH para 4,5 com ácido acético	Imersão em H ₂ O a 90°C por 2 h	Aquecimento à temperatura de ebulição com NaOH 0,5 mol.L ⁻¹ por 15 min e lavagem com H ₂ O	Submersão em NaOH a 1% por 48 h, seguida por lavagem para retirada de álcali
Lin <i>et al.</i> (2009)	Lavagem com H ₂ O por 12 h para remoção das impurezas	Aquecimento, à temperatura de ebulição, em NaOH 0,5N por 10 min	Submersão em NaOH 0,5N por 24 horas, à temperatura ambiente	Enxágue com H ₂ O até pH neutro
Sakairi <i>et al.</i> (1997)	Aquecimento à temperatura de ebulição durante 3 h em SDS a 2%, lavagem com H ₂ O e aquecimento à temperatura de ebulição em solução NaOH % por 1,5 h	Lavagem extensivamente com H ₂ O e secagem a temperatura inferior a 60°C	Lavagem com etilenoglicol a 10% três vezes	Secagem a temperatura inferior a 60°C sob vácuo
Yang <i>et al.</i> (1998)	Duas lavagens com H ₂ O	Submersão em NaOH 0,25M a 90°C por 30 min	Duas lavagens com H ₂ O	Secagem a 80°C até peso constante
Setyawati <i>et al.</i> (2007)	Submersão em NaOH 1N a 95°C por 20 min	Lavagem com H ₂ O	Secagem a 70° C por 12 h	
Son <i>et al.</i> (2003)	Lavagem com H ₂ O	Submersão em NaOH 0,5N a 90°C por 1 h	Lavagem com H ₂ O até pH neutro.	Secagem a 105°C até peso constante
Naritomi <i>et al.</i> (2002)	Submersão em NaOH 5 mol.L ⁻¹ a 90°C por 1 h	Três lavagens com H ₂ O	Secagem a 105°C até peso constante	

Gea *et al.* (2011) identificaram três etapas do processo de transformação, de acordo com estudos previamente realizados. A primeira corresponde ao intumescimento das fibras devido à absorção de água, o que leva a um significativo aumento da mobilidade das cadeias de celulose. O fenômeno secundário ocorre quando a solução alcalina penetra nas áreas amorfas, satura a celulose e rompe numerosas ligações de hidrogênio primário intermoleculares e intramoleculares nas regiões cristalinas da celulose I. Essa

etapa promove a mudança da conformação paralela em anti-paralela na celulose e o surgimento de polimorfos. A última etapa acontece quando a solução mercerizante é retirada por lavagem, carreando os componentes do meio de cultura, proteínas e ácidos nucleicos derivados das células bacterianas, permitindo a formação de fortes ligações de hidrogênio intra e interfibrilares e os novos planos cristalinos são formados. Estes autores acrescentam que, na etapa de lavagem, acontece a remoção das regiões cristalinas e amorfas que cobrem a superfície superior da estrutura da celulose, que reagem com a solução alcalina (GEA *et al.*, 2011).

George *et al.* (2005) avaliaram as propriedades físico-mecânicas da celulose produzida por uma cepa de *G. xylinus* isolada de chá de Kombucha. Testaram a celulose nativa e amostras submetidas a diferentes tratamentos de purificação com NaOH, KOH, Na₂CO₃ e K₂CO₃ e verificaram que os tratamentos realizados reduziram a coloração da membrana. A força tênsil, a taxa de transmissão de oxigênio aumentam a capacidade de retenção de água. A força tênsil e a elongação da membrana nativa tratada com hidróxidos de sódio ou potássio apresentaram maior redução dentre as amostras testadas (superior a 65 MPa e 30%, respectivamente), seguida pelas amostras tratadas com os carbonatos de sódio ou de potássio.

A introdução de novas tecnologias para o processo de purificação como a utilização de micro-ondas pode promover economia pela redução do tempo de processo e pela eficiência de aquecimento de materiais compostos por moléculas que sejam dipolos. Uma de suas vantagens é produzir um aquecimento interno eficiente para a maioria das reações químicas, fornecendo energia exatamente onde ela é necessária, mesmo em condições exotérmicas (MENÉNDEZ *et al.*, 2010). Outra vantagem importante do uso de micro-ondas é a redução do tempo da reação, de dias ou horas para minutos. Esses motivos são suficientes para promover o uso de micro-ondas em processos químicos, como na remoção de células das membranas de celulose.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Processos Biotecnológicos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco; no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) e na Central Analítica da UFPE, onde foram realizadas as análises físico-químicas de caracterização do produto.

4.1 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTURA

O micro-organismo utilizado para a produção de celulose bacteriana foi *Gluconacetobacter xylinus* (ATCC 23767), cuja manutenção foi feita em ágar manitol, composto por D-manitol, 25 g.L⁻¹; peptona, 3 g.L⁻¹; extrato de levedura, 5 g.L⁻¹; e ágar bacteriológico, 15 g.L⁻¹; de acordo com a ficha do produto da ATCC (ATCC, 2015).

O meio utilizado para a produção de celulose foi o caldo HS (HESTRIN & SCHRAMM, 1953), composto por: glicose, 20 g.L⁻¹; peptona de carne, 5 g.L⁻¹; extrato de levedura, 5 g.L⁻¹; Na₂HPO₄, 2,7 g.L⁻¹; e ácido cítrico, 1,15 g.L⁻¹. Esse meio foi empregado nas etapas de síntese de celulose com diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, sacarose, glicerol, xilose e mistura glicose e frutose) ou de nitrogênio (extrato de levedura e peptona ou sulfato de amônio), assim como nos testes de resistência do micro-organismo a produtos tóxicos presentes na glicerina bruta e no hidrolisado do bagaço de cana de açúcar.

4.2 PRODUÇÃO DOS INÓCULOS

Para o preparo dos inóculos, a cultura de *G. xylinus* foi inicialmente ativada em caldo HS (Hestrin & Schramm, 1953), composto por: glicose, 20 g.L⁻¹; peptona de carne, 5 g.L⁻¹; extrato de levedura, 5 g.L⁻¹; Na₂HPO₄, 2,7 g.L⁻¹;

e ácido cítrico, $1,15 \text{ g.L}^{-1}$. Após a incubação do caldo por 48 h a 30°C , $200 \mu\text{L}$ desta cultura foram semeados em placas de Petri com 90 mm de diâmetro contendo HS sólido (obtido pela adição de agar bacteriológico a 15 g.L^{-1} ao caldo HS), distribuindo-se o volume por toda a superfície do meio com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas por cinco dias a 30°C para crescimento da massa celular na superfície do meio. A massa celular crescida foi transferida para frascos Erlenmeyer contendo caldo HS em volume equivalente a 1/5 de sua capacidade e mantendo-se a proporção de biomassa de cada duas placas para cada 50 mL de caldo. Os meios foram submetidos à agitação com barra magnética até que os grumos de células e celulose fossem desfeitos e incubados a 30°C e $150 \pm 1 \text{ rpm}$ de agitação por 48 h, antes de serem utilizados como inóculos.

4.3 PRODUÇÃO DE CELULOSE

Os ensaios foram realizados em caldo HS original (tendo como fonte de carbono a glicose), bem como modificado pela substituição da glicose por diferentes fontes de carbono na concentração de 20 g.L^{-1} (sacarose, frutose, glicerol ou xilose). Na mistura frutose + glicose a concentração de cada açúcar foi ajustada para 10 g.L^{-1} .

Para teste de produção de celulose com cada fonte de carbono, foram preparados nove frascos com caldo HS (original ou modificado), contendo 10% do volume em inóculo. Para cada fonte de carbono, foram realizados ensaios sendo sem agitação e os demais em diferentes velocidades de agitação, em incubador rotativo com controle de temperatura a 30°C (fontes de carbono glicose, xilose e glicerol, nas velocidades de $100 \pm 1 \text{ rpm}$, $150 \pm 1 \text{ rpm}$ e $200 \pm 1 \text{ rpm}$; frutose, frutose+glicose e sacarose nas velocidades de $100 \pm 1 \text{ rpm}$ e $200 \pm 1 \text{ rpm}$). Todos os experimentos tiveram duração de 7 dias. Amostras de 5 mL foram coletadas da fase líquida, no início e no final dos ensaios, para medida do valor de pH e das concentrações de biomassa, substrato e acetana. A concentração de celulose produzida e a capacidade de retenção de água (CRA) da mesma foram aferidas exclusivamente no tempo final do processo.

Para aferir a concentração de celulose, sem células, as membranas produzidas foram purificadas pela lavagem inicial com água destilada, para a retirada do excesso de meio e de componentes solúveis. Em seguida foram transferidas para solução de NaOH 0,5 mol.L⁻¹ e submetidas, nessa solução, a 90°C por 1 h (NGUYEN *et al.*, 2010). Em seguida foram lavadas por imersão em água destilada, com troca da água após períodos maiores que 2 h, até que a água de lavagem atingisse pH neutro. As membranas purificadas foram mantidas, sob refrigeração, em água mineral gaseificada a fim de facilitar a remoção de possíveis resíduos de NaOH e reduzir o crescimento de bactérias contaminantes.

4.4 PURIFICAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO E TEMPOS DE AQUECIMENTO EM FORNO DE MICRO-ONDAS

Para avaliação de efeitos principais e de interação dos fatores [NaOH] e tempo (min) de aquecimento em forno de micro-ondas, empregou-se planejamento fatorial completo 2² com composto central e pontos axiais. A faixa escolhida para variação do fator [NaOH] foi 0,00 mol.L⁻¹ a 1,00 mol.L⁻¹ e, para o tempo de aquecimento, admitiu-se variar entre 1,00 min a 15,00 min, incluindo os pontos axiais (Tabela 1). As variáveis dependentes foram CRA, índice de cristalinidade e variação na espessura das fibrilas da celulose. Os cálculos foram feitos usando o programa estatístico IBM SPSS Statistics® 20.

Cada membrana coletada do meio de cultura foi rinsada com água destilada; submersa em 200 mL de solução de NaOH em frascos Pyrex de 500 mL com tampas rosqueadas frouxamente, e aquecida em forno de micro-ondas Panasonic® (Modelo Perfect NN-ST568WRUK), com potência nominal de 800 Watts. A temperatura inicial das soluções foi de 26 ± 2°C e a temperatura máxima que pode ter sido atingida foi de 100°C. As membranas submetidas aos diferentes tratamentos foram resfriadas em ambiente até 45 ± 5°C e, então, transferidas para recipientes contendo água destilada a aproximadamente 26°C para iniciar a etapa de lavagem. A água destilada foi trocada em intervalos mínimos de 2 h até pH 7,0 ± 0,5. As membranas foram mantidas em água

gaseificada até a liofilização. Cada membrana liofilizada foi avaliada quanto: (a) à presença de células de *Gluconacetobacter xylinus*, pela observação da superfície por microscopia eletrônica de varredura (MEV); (b) à capacidade de retenção de água (CRA); e (c) às mudanças nas características estruturais da celulose por difratometria de Raios X (dRX), análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria de escanemamento diferencial (DSC).

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial 2² incluindo os pontos central e axiais usados para investigar a influência da concentração de NaOH (g.L⁻¹) e do tempo de aquecimento em forno de micro-ondas sobre as características da celulose bacteriana tratada.

Ensaio	Níveis		Condições	
	[NaOH]	T (min)	[NaOH]	T (min)
1	+1	+1	0,85	12,70
2	-1	+1	0,15	12,70
3	+1	-1	0,85	3,30
4	-1	-1	0,15	3,30
5	+ α	0	1,00	7,00
6	- α	0	0	7,00
7	0	+ α	0,50	15,00
8	0	- α	0,50	1,00
9	0	0	0,50	7,00
10	0	0	0,50	7,00
11	0	0	0,50	7,00

+, - = níveis do planejamento fatorial; 0 = ponto central; + α e - α = pontos axiais

4.5 PRODUÇÃO DE FILMES COMESTÍVEIS

Para produção dos filmes comestíveis, procedeu-se à produção de membranas de celulose em frascos Erlenmeyer com capacidade para 250 mL contendo 50 mL de meio composto por glicerol (20 g.L⁻¹), extrato de levedura (5 g.L⁻¹), peptona (5 g.L⁻¹), Na₂HPO₄ (2,7 g.L⁻¹) e ácido cítrico (1,15 g.L⁻¹). O pH do meio foi ajustado para 6,0 com soluções de NaOH 1 mol.L⁻¹ e H₂SO₄ 1 mol.L⁻¹. Os frascos foram fechados com cilindros de espuma de poliuretano D33 (~29,7 Kg.m⁻³) com 4 cm de diâmetro e 7 cm de comprimento, de forma a permitir velocidade padronizada de transferência de gases com a atmosfera. Após esterilização a 121°C / 15 min, em autoclave, adicionaram-se 5 mL do

inóculo, volume que correspondia a 10% do volume final. Os frascos foram incubados a 30°C por 10 dias.

Todos os filmes foram produzidos pelo método de coacervação simples, utilizando-se soluções aquosas de manitol e glicerol, cujo planejamento está detalhado na Tabela 2. Cada membrana foi submersa em 100 mL da respectiva solução, em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Essa solução foi submetida ao aquecimento em forno de micro-ondas Consul modelo-CMA20BBBNA, a uma potência de 620 W, por 5 min. Em seguida, os filmes foram dispostos em placas de Petri previamente limpas, secas em estufa a 110°C por 1 h. Após os filmes serem postos nas placas, foram secos em estufa a 50° C até peso constante.

Tabela 2. Planejamento fatorial para avaliação da influência das concentrações dos polióis utilizadas na produção de filmes comestíveis de celulose.

Ensaio	Níveis		Condições	
	Manitol (g.L ⁻¹)	Glicerol (g.L ⁻¹)	Manitol (g.L ⁻¹)	Glicerol (g.L ⁻¹)
E1	+1	+1	30,6	69,8
E2	-1	+1	3,8	69,8
E3	+1	-1	30,6	7,4
E4	-1	-1	3,8	7,4
E5	+α	0	35,0	45,0
E6	-α	0	5,0	45,0
E7	0	+α	20,0	80,0
E8	0	-α	20,0	10,0
E9	0	0	20,0	45,0
E10	0	0	20,0	45,0
E11	0	0	20,0	45,0

+, - = níveis do planejamento fatorial; 0 = ponto central; +α e -α = pontos axiais.

Todos os filmes foram avaliados quanto à espessura, à solubilidade em água, ao intumescimento e à permeabilidade do vapor de água. Foram também caracterizados por dRX e MEV.

A solubilidade dos filmes produzidos em água foi determinada pela adaptação do método de Gontard *et al.* (1996), utilizando-se amostras de 2 cm² (quadrados) do filme, cuja massa inicial foi denominada m₀. Em seguida, os quadrados de filme foram submersos em 50 mL de água destilada com pH neutro, por 24 h, sob agitação periódica. Após esse período, a água foi retirada

e o filme foi seco em estufa a 105°C por 24 h, ao final das quais, as amostras foram novamente pesadas (m_f). A solubilidade foi expressa em percentual de massa inicial, de acordo com a equação 1 (BARUD, 2006; GONTARD et al., 1996).

$$S=(m_0 - m_f) \times 100 / m_0 \quad (1)$$

A espessura dos filmes foi determinada em milímetros, utilizando-se um micrômetro mecânico Insize[®] (modelo 3210-25a), variação de até 25 mm e precisão a 0,001 mm.

A transparência dos filmes e barreira à luz foi medida com espectrofotômetro UV-VIS (Quimis[®], modelo Q798U2VS), pelo posicionamento dos quadrados de filmes na superfície interna de uma das faces transparentes da cubeta de acrílico, evitando-se o aprisionamento de bolhas de ar. A leitura foi realizada a 1.000 nm e a transparência foi calculada pela equação 2 (MU et al., 2012).

$$\text{Transp} = -\log T/x \quad (2)$$

onde: T - valor de transmitância

x - média das medidas de espessura em cada quadrado do filme (mm).

Para determinação da taxa de intumescimento foram empregadas amostras de 1 cm² para os quais foi determinada a massa (M_s). Em seguida foram mergulhados em 25 mL de água destilada contidos em frasco Erlenmeyer 50 mL e mantidos em geladeira a 4°C. A amostra foi pesada em balança semianalítica até atingir peso constante (M_u). A taxa de intumescimento foi calculada pela equação 3 (MU et al., 2012).

$$TI=(M_u - M_s)/M_s \times 100 \quad (3)$$

A medida da permeabilidade dos filmes ao vapor de água foi realizada utilizando um Erlenmeyer 50 mL com 25 mm de diâmetro interno, previamente limpo e seco. Ao mesmo foram adicionados 10 mL de solução saturada de ZnSO₄ (RH 90%), procedendo-se à vedação com o filme teste produzido. Este conjunto foi pesado (Mi) e posto em dessecador por 48 horas com sílica gel desidratada, à temperatura ambiente. Após esse período, ele foi novamente pesado (Mf), sendo a permeabilidade calculada pela equação 4 (MU *et al.*, 2012).

$$WVP = W.x / [t.S.(vp_1 - vp_2)] \quad (4)$$

em que: W é a quantidade de vapor de água que atravessa o filme após 48h,

expressa em g e calculada pela equação $W = (M_i - M_f)$

x é a espessura do filme em milímetros

t indica o tempo em horas

S é a área de permeação do filme (expressa em m²), calculada pela fórmula $S = (\pi \cdot R^2)$ na qual R²= raio da circunferência interna da vidraria utilizada.

vp₁ é a pressão de vapor de água pura (100%)

vp₂ é a pressão do vapor de água da sílica em gel (0%)

4.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

As determinações analíticas incluíram procedimentos de quantificação (dos substratos, de celulose produzida, capacidade de retenção de água (CRA) das membranas, de acetana, da biomassa e determinação do pH), assim como análises estruturais da celulose (espessura de fibras celulósicas por microscopia eletrônica de varredura, índice e grau de cristalinidade, distância

entre os planos cristalinos e diâmetro médio dos cristais perpendiculares aos planos de difração da celulose e dos filmes comestíveis por dRX, determinação de grupos funcionais por FT-IR).

Determinações quantitativas

As fontes de carbono utilizadas (sacarose, frutose, glicose, glicerol e xilose) foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (Cromatógrafo Hewlett Packard[®], série 1100. Agilent Technologies), empregando coluna Aminex[®] (modelo HPX-87H, 300 mm x 7,8 mm) com vazão de 0,6 mL/min, para fase móvel H₂SO₄ 5 mM a 60 °C.

Para quantificação, a celulose produzida foi purificada em solução de NaOH, conforme descrito por Goelzer *et al.* (2009). Após purificação, determinou-se a massa de celulose por secagem a 80°C até peso constante. No mesmo procedimento, determinou-se a CRA, segundo Equação 5 (SHEZAD *et al.*, 2010).

$$\text{CRA} = \text{massa removida durante a secagem} / \text{peso-seco da celulose} \quad (5)$$

A quantificação de acetana foi realizada pelo método de Couso *et al.* (1987) adaptado. Cinco mililitros do caldo, filtrados em membranas com poros de 0,45 µm de diâmetro, foram transferidos a tubos de centrífuga aos quais foram adicionados 15 mL de etanol absoluto gelado, para a insolubilização do polímero. A mistura foi centrifugada a 9200 x g por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso com água destilada e transferido para pesa-filtros tarados, os quais foram pesados após manutenção em estufa a 105°C até peso constante.

O cálculo dos fatores de conversão do substrato em celulose e acetana, foi realizado de acordo com a equação 6.

$$Y_{PS} = \Delta P / \Delta S, \quad (6)$$

em que ΔP é a diferença entre as concentrações iniciais e finais do produto (celulose ou acetana) nos tempos inicial e final dos experimentos e ΔS é a diferença entre as concentrações iniciais e finais da fonte de carbono nos tempos inicial e final dos experimentos.

A medida da biomassa foi realizada pela medida da dispersão da luz pelas células em espectrofotômetro (Hewlett Packard[®], modelo G1103A) a 600 nm após a construção de uma curva de calibração utilizando, ao menos, nove concentrações da suspensão de células e R^2 maior que 0,99. A curva de calibração foi construída após a obtenção de quantidade suficiente de células em meio HS, centrifugando o meio para a separação das células e transferindo-se para o balão volumétrico de menor volume possível para a obtenção da suspensão mãe. Desta suspensão foram realizadas diluições e de todas as suspensões foram lidas as absorvâncias a 600 nm. Da mesma suspensão foram retiradas três amostras de exatos 5 mL para béqueres com capacidade para 100 mL previamente identificados, secos a 105°C durante 24h e pesados em balança analítica. Os béqueres foram então devolvidos à estufa onde permaneceram por mais 24 h e novamente pesados. A média das diferenças entre as massas pesadas com e sem as células secas foi utilizada para o cálculo da concentração de células na suspensão mãe e nas suspensões resultantes das diluições da mesma. Os dados (concentração versus absorvância) foram plotados e, do trecho de reta da curva de calibração resultante, foi estabelecida a equação da reta, a qual foi usada para o cálculo da concentração de células nas amostras coletadas dos experimentos a partir da leitura de suas absorvâncias.

A diferença entre a concentração de células nos tempos inicial e final (ΔX), bem como a diferença da concentração da fonte de carbono nos tempos inicial e final (ΔS) foram utilizadas para o cálculo do fator de conversão do substrato em biomassa (Y_{XS}), conforme descrito na Equação 7:

$$Y_{xs} = \Delta X / \Delta S \quad (7)$$

O pH foi aferido utilizando-se pHmetro analógico, digital (Corning[®], modelo 430).

Análises estruturais

A determinação da espessura de fibras celulósicas foi realizada utilizando-se o programa Image J, nas fotos obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), que foram realizadas no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE). As amostras liofilizadas foram metalizadas com uma camada de 10 nm de ouro, utilizando-se o metalizador Leica[®] (modelo EM SCD 500), e analisadas com o auxílio do microscópio eletrônico de varredura QUANTA[®], modelo 200 FEG, no modo de alto vácuo.

Para determinação de índice e grau de cristalinidade da celulose e dos filmes, empregou-se difratômetro de raios-X (Bruker[®], modelo D8 *Advance Davinci*) com fonte de radiação anódica de Cu ($K\alpha=1.540562\text{Å}$), pertencente ao CETENE. As amostras foram escaneadas com varredura variando de 0° a 80°, em um ângulo 2θ , a um passo de 2°min^{-1} por 60 min.

Da análise dos difratogramas da celulose, foram calculados o índice de cristalinidade (CI) (com a equação 8) e o grau de cristalinidade (%C), (com a equação 9), como descrito por Rosli, Ahmad & Abdulah (2013) (KIZILTAS *et al.*, 2015).

$$CI = (I_{002} - I_{am}) / I_{002} \quad (8)$$

$$\%C = (I_{002} / (I_{002} + I_{am})) \times 100 \quad (9)$$

em que: I_{002} é a máxima intensidade de difração do pico do plano (002) ($2\theta=22^\circ$ a 23°)

I_{am} é a intensidade de difração referente ao material amorfo ($2\theta = 18^\circ$ a 19°), com intensidade mínima.

A distância entre os planos cristalinos das células unitárias da celulose e dos filmes comestíveis foi avaliada de acordo com a Lei de Bragg, expressa pela equação 10 (Callister e Rethwisch, 2014).

$$D_{hkl} = \frac{n\lambda}{2 \sin\theta} \quad (10)$$

em que: n é a ordem da reflexão (1, neste caso)

λ é o comprimento de onda da radiação X, constante para Cu e igual a 0,1542

θ é o ângulo de difração.

O diâmetro médio dos cristais perpendiculares aos planos de difração da celulose e dos filmes comestíveis foram calculados pela equação 11, de Scherrer (Li & Renneckar, 2011).

$$d = \frac{0,9\lambda}{B \cos\theta} \quad (11)$$

em que: λ é o comprimento de onda da radiação X, constante para Cu e igual a 0,1542

B é a largura de linha do pico de difração na metade da intensidade máxima (em radianos)

θ é o ângulo de difração.

Para o cálculo do grau de cristalinidade dos filmes comestíveis, produzidos com glicerol e manitol como fontes de carbono, foi necessário o emprego de outra fórmula (equação 12), para retirar a interferência de cristais distintos da celulose sobre a cristalinidade:

$$\%C = (I_c / (I_c + I_a)) \times 100 \quad (12)$$

em que: I_c é o somatório das áreas dos picos cristalinos

I_a é a área correspondente à região amorfa do difratograma

A verificação da presença de grupos funcionais nas amostras foi realizada por espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) utilizando-se o equipamento Bruker Vetex 70 pelo método de ATR (atenuação total de reflectância).

4.7 TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Foi realizada análise de variância (ANOVA) a um fator e teste de Turkey para a determinação dos efeitos principais e de interação entre os fatores, com nível de significância de 0,05.

Os dados foram apresentados sob forma de tabelas e de gráficos com médias marginais, utilizando-se o programa *IBM SPSS Statística*® (*SPSS 20.0 for Window, SPSS Inc., Chicago, IL, USA*). Utilizou-se também o programa Origin 8.0 para a construção dos gráficos de superfície, difratogramas e espectrogramas resultantes das análises estruturais.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DE CELULOSE

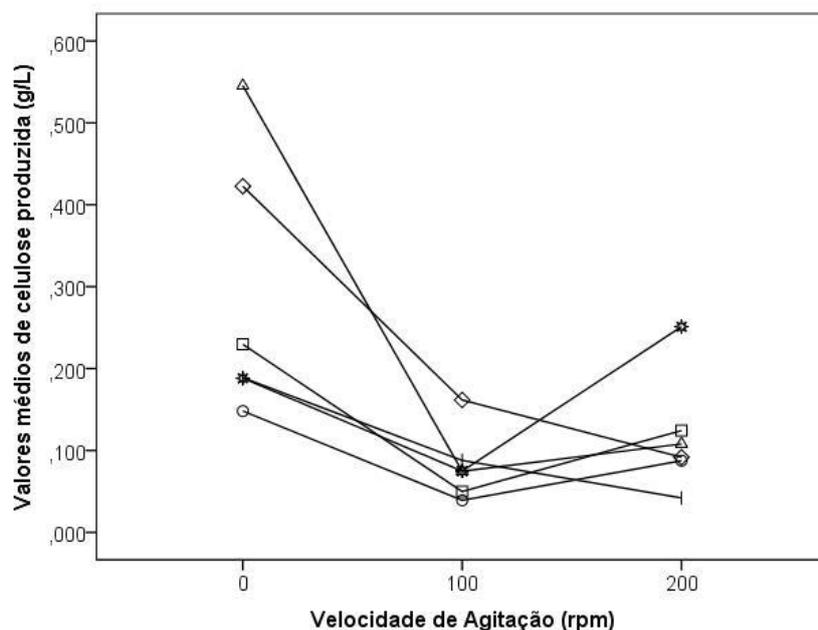
Nesta etapa, buscou-se analisar os efeitos principais e de interação das fontes de carbono e da velocidade de agitação sobre a produção de celulose, a produção de células, o consumo de substrato, a capacidade de retenção de água da celulose produzida, a síntese de acetana e o pH final do meio de produção.

Efeitos sobre a produção de celulose

A mudança do substrato influenciou significativamente a produção de celulose. No processo sem agitação, a produção em meio com a mistura Fru+Gli ($1,09 \pm 0,07 \text{ g.L}^{-1}$) foi a que resultou em maiores quantidades de celulose, seguida do meio com glicose ($0,84 \pm 0,11 \text{ g.L}^{-1}$) e com frutose ($0,46 \pm 0,03 \text{ g.L}^{-1}$), enquanto que, com o meio preparado com sacarose, obteve-se a menor produção ($0,29 \pm 0,07 \text{ g.L}^{-1}$) (Figura 15). Semelhante resultado também foi observado por Ruka et al. (2012) quando comparou a produção de celulose em diferentes meios, e com diferentes fontes de carbono, como glicose, frutose, manitol e glicerol, o que explicou pelo fato de a fase *lag* de crescimento do micro-organismo ser mais longa quando em meio com sacarose como fonte de carbono.

O fato de *G. xylinus* crescer e ser capaz de produzir celulose em meios contendo sacarose indica a presença de enzima com atividade de invertase. Esta atividade foi identificada em *G. xylinus* por Kornmann *et al.* (2003), porém a liberação dos monossacarídeos glicose e frutose a partir da sacarose ou mesmo o transporte para o interior da célula, não atenderam à demanda para o crescimento bacteriano e a produção de celulose em velocidade equivalente à observada nos meios que receberam a mistura Fru+Gli como fonte de carbono, Daí decorreu que a concentração final de celulose em meios de sacarose foi consideravelmente menor à obtida em meio contendo a mistura Fru+Gli.

Figura 14. Relação entre velocidade de agitação em meios com diferentes fontes de carbono e concentração média de celulose produzida



Fonte: da Autora

Legendas: Fontes de carbono: (O) Sacarose, (□) Frutose, (◇) Glicose, (Δ) Frutose + Glicose (Fru+Gli), (*) Glicerol, (l) Xilose. Os desvios-padrão foram inseridos no texto, imediatamente após cada dado citado.

Esses resultados sugerem que, quando forem utilizados substratos contendo sacarose, deve-se considerar que maiores quantidades de celulose serão obtidas se uma etapa prévia de inversão deste açúcar for realizada.

Yang *et al.* (1998) testaram a produção de celulose por *G. xylinus* BRC5 em meios de sacarose, glicose, frutose e obtiveram a maior produção de celulose em meio de frutose, porém houve ainda um aumento de 3,2% na produção de celulose quando esses autores combinaram glicose e frutose (1:3). Analogamente, na presente tese, a combinação de glicose e frutose (1:1) resultou em aumento de 236,9 % na produção de celulose em relação à produção exclusivamente com frutose.

Pode-se aventar a hipótese de que a maior produção de celulose também pode ter sido influenciada pela osmolaridade do meio, uma vez que a mistura dos dois açúcares na concentração de 10 g.L⁻¹ resulta em osmolaridade calculada 90% maior que a de um meio contendo sacarose na concentração de 20 g.L⁻¹, assim como a produção de levana e alginato pelas

bactérias *Zymomonas mobilis* e *Pseudomonas syringae*, respectivamente, favorecida pela elevação da osmolaridade do meio (SINGH e FETT, 1995; VIGANTS et al., 1996).

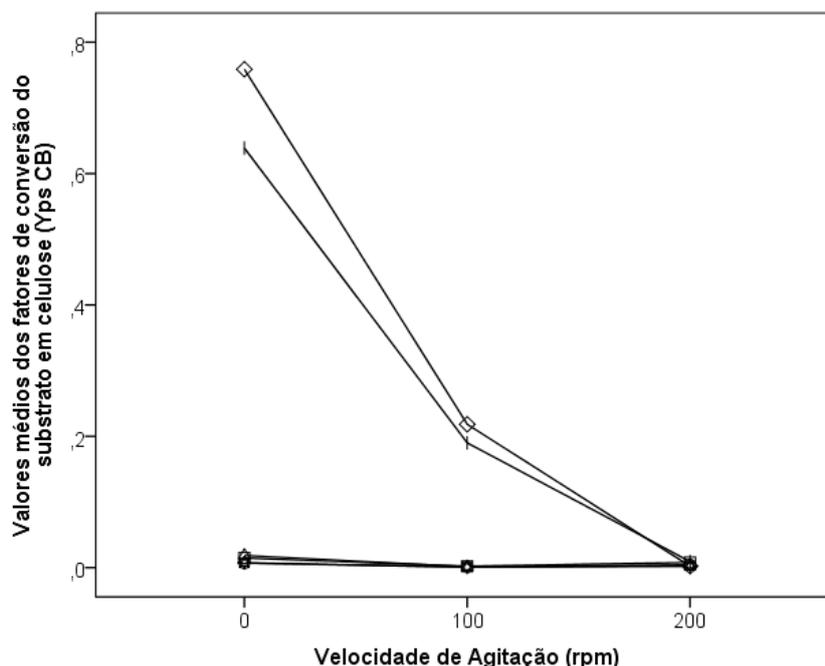
A velocidade de agitação também influenciou de forma significativa a produção de celulose, como pode ser verificado na Figura 15. Em todos os meios, admitindo como valor de referência a produção de celulose no cultivo estático, identificou-se redução considerável de produção com agitação em qualquer velocidade, exceção feita aos meios com glicerol como fonte de carbono. Nos meios cujo substrato foi glicerol, os experimentos realizados a 200 rpm resultaram em maiores produções de celulose ($0,50 \pm 0,047 \text{ g.L}^{-1}$), superando a quantidade obtida em cultivo estático ($0,38 \pm 0,005 \text{ g.L}^{-1}$).

Ao comparar as concentrações de celulose produzidas com diversas velocidades de agitação, observou-se que meios agitados a 200 rpm resultaram em concentrações maiores do que a 100 rpm, exceto nos meios produzidos com xilose em que a produção se mostrou inversamente proporcional ao aumento da velocidade de agitação, justificando o efeito de interação entre os fatores apontado pela análise dos dados.

Os efeitos principais do substrato e da velocidade de agitação sobre os fatores de conversão dos substratos em celulose bacteriana (Yps(CB)) foram significativos, porém não houve efeito de interação entre eles ($p = 0,051$).

O fator de conversão diferiu significativamente entre as fontes de carbono consumidas pela bactéria. O maior fator de conversão de substrato em celulose foi obtido para os meios com glicose ($0,76 \pm 0,14$) e xilose ($0,64 \pm 0,14$), sob cultivo estático (Figura 16).

Figura 15. Relação entre velocidade de agitação em meios com diferentes fontes de carbono e fator de conversão do substrato em celulose



Fonte: da Autora

Legendas: Fontes de carbono: (O) Sacarose, (□) Frutose, (◇) Glicose, (Δ) Frutose + Glicose (Fru+Gli), (✱) Glicerol, (l) Xilose. Os desvios-padrão foram inseridos no texto, imediatamente após cada dado citado.

De acordo com Ishihara *et al.* (2002), D-xilose é oxidada a ácido d-xilônico por outra cepa de *G. xylinus* e o xilonato se acumula no meio resultando em queda acentuada do pH, desfavorável à produção de celulose. No entanto, a adição de xilulose e xilose isomerase ao meio de cultura elevou 24,5 vezes o rendimento em celulose nos experimentos realizados por esses autores. Considerando tais fatos, pode-se afirmar que *G. xylinus* neste trabalho provavelmente converteu a xilose, isomerizada a xilulose, a CB, porém a velocidade de conversão de xilose a xilulose provavelmente foi reduzida, limitando sua utilização e, conseqüentemente, a produção de celulose.

O Yps(CB) para os demais substratos não superou 0,019 e a 200 rpm a Yps(CB) dos experimentos realizados com todos os substratos não superou 0,009. As Yps(CB) de glicose e xilose, em cultivo estático, sofreram redução com o aumento da velocidade de agitação para 100 rpm ($0,218 \pm 0,019$ e $0,190 \pm 0,019$, respectivamente), provavelmente porque o aumento da velocidade de agitação elevou a concentração de oxigênio dissolvido e estimulou a conversão

de glicose e xilose a ácido glucônico e ácido d-xilônico, respectivamente (KESH; SAMESHIMA, 2005; YANG *et al.*, 1998; ISHIHARA *et al.*, 2002), o que pode ser confirmado pelo valor do pH final, menor que 4,0 apenas nestes meios. Essas conversões reduziram a disponibilidade de substrato para produção de celulose. A influência da agitação sobre a *Yps*(CB) foi a mesma para todas as fontes de carbono testadas, ou seja, a conversão foi reduzida com o aumento da agitação (Figura 16).

Ainda em relação à velocidade de agitação, deve-se considerar que ela afeta a distribuição da celulose bacteriana sintetizada. A agitação faz com que a síntese não se dê sob forma de membrana, facilitadora de dispersão das células na superfície líquido-ar, mas sob forma de agregado, como se observa na Figura 17. A inviabilidade de obtenção da celulose em forma de membrana, pode não representar um grande problema caso o formato do polímero não seja importante para a aplicação posterior pretendida. Mesmo assim deve-se considerar a modificação da aeração da biomassa.

Figura 16. Imagens de celulose bacteriana



Legendas: esquerda - produzida em cultivo estático; direita - sob agitação

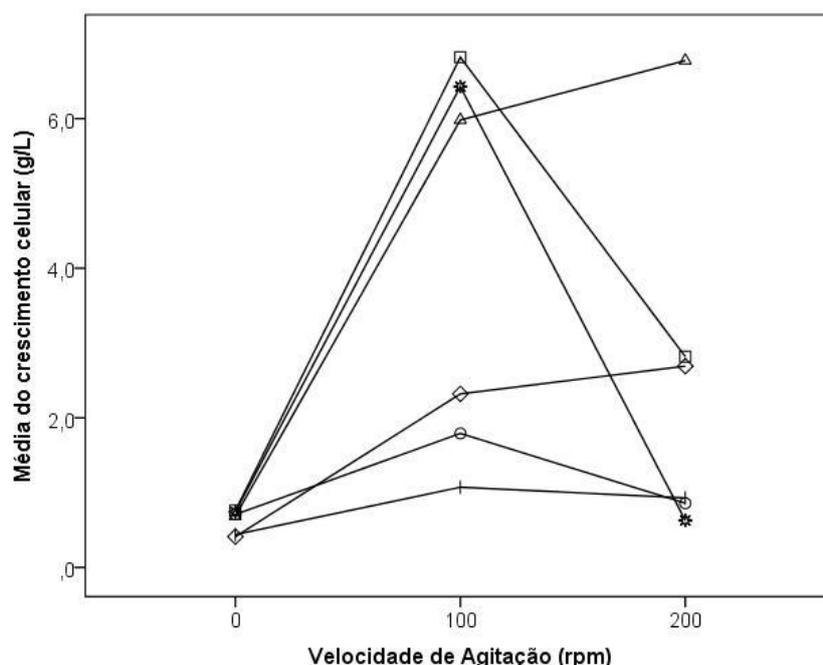
Efeitos sobre a produção de células

O perfil geral de crescimento da biomassa mostrou comportamento inverso ao verificado para a produção de celulose, pois foi menor em cultivo estático e aumentou acentuadamente a 100 rpm, reduzindo-se com o aumento da velocidade de agitação na maioria dos substratos.

Nos experimentos realizados a 100 rpm, meios contendo frutose, mistura Fru+Gli e glicerol possibilitaram maior crescimento de biomassa no líquido ($6,8 \pm 0,57$; $5,98 \pm 0,57 \text{ g.L}^{-1}$; e $6,43 \pm 0,70 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente); o menor crescimento foi obtido no meio com glicose ($2,32 \pm 0,57 \text{ g.L}^{-1}$), sacarose ($1,79 \pm 0,57 \text{ g.L}^{-1}$) e xilose ($1,07 \pm 0,57 \text{ g.L}^{-1}$). A elevação da velocidade de agitação para 200 rpm provocou a redução da quantidade de células no líquido para todos os substratos testados, exceto glicose e a mistura Fru+Gli, cuja biomassa continuou aumentando com a elevação da velocidade de agitação, o que justifica o efeito de interação entre os fatores.

A agitação dos meios a 100 rpm promoveu maior crescimento de biomassa nos experimentos, em relação ao cultivo estático, portanto pode ser indicada para a produção de inóculos. Os meios com glicose e a mistura Fru+Gli apresentaram crescimento maior a 200 rpm, o que indicou a necessidade de maior oxigenação para o crescimento da bactéria em meios contendo glicose (Figura 18).

Figura 17. Relação entre velocidade de agitação em meios com diferentes fontes de carbono e média do crescimento celular



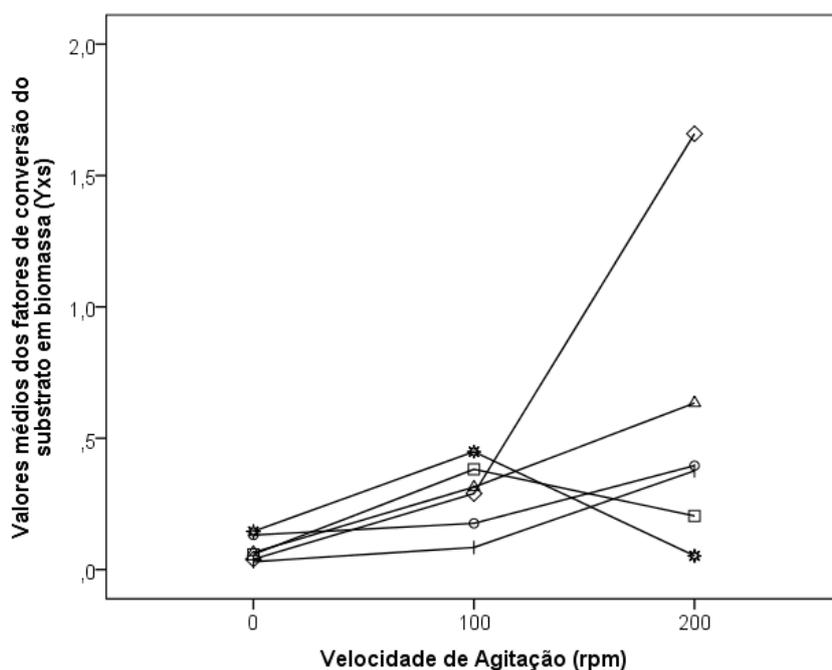
Fonte: Dados da pesquisa

Legendas: Fontes de carbono: (O) Sacarose, (□) Frutose, (◇) Glicose, (Δ) Frutose + Glicose (Fru+Gli), (*) Glicerol, (l) Xilose. Os desvios-padrão foram inseridos no texto, imediatamente após cada dado citado.

A celulose é produzida durante o crescimento celular e está relacionada com a quantidade de células produtoras, mas a disponibilidade de oxigênio parece determinar o que será priorizado pela célula. O crescimento de *G. xylinus* é fortemente limitado pela disponibilidade de oxigênio no meio e concentrações reduzidas deflagram a produção de celulose na superfície do meio de cultura para que as células sejam mantidas na interface líquido-ar, portanto na camada mais oxigenada do líquido (ROSS *et al.*, 1991). No entanto o aumento da velocidade de agitação eleva a concentração de oxigênio no meio por favorecer a troca gasosa, o que se associa ao aparecimento de células mutantes não produtoras de celulose, do que decorre menor rendimento deste polímero (YANG *et al.*, 1998).

Na Figura 19 tem-se a análise das variações do fator de conversão de substrato em biomassa.

Figura 18. Relação entre velocidade de agitação em meios com diferentes fontes de carbono e média dos fatores de conversão de substrato em biomassa



Fonte: Dados da pesquisa

Legendas: Fontes de carbono: (O) Sacarose, (□) Frutose, (◇) Glicose, (Δ) Frutose + Glicose (Fru+Gli), (*) Glicerol, (I) Xilose. Os desvios-padrão foram inseridos no texto, imediatamente após cada dado citado.

O Y_{xs} aumentou com o aumento da velocidade de agitação dos frascos de 0 a 200 rpm. Nos meios contendo glicose ou a mistura Fru+Gli, na velocidade de 200 rpm, foram obtidos os maiores Y_{xs} ($1,66 \pm 0,13$ e $0,63 \pm 0,07$, respectivamente). No entanto, nos meios com glicerol e frutose, como fontes de carbono, os Y_{xs} diminuíram com o aumento da velocidade de 100 rpm ($0,45 \pm 0,09$ e $0,38 \pm 0,07$, respectivamente) para 200 rpm ($0,05 \pm 0,07$ e $0,2 \pm 0,09$), evidenciando o efeito de interação entre os fatores (Figura 19).

Esses resultados indicam que a conversão de substrato em biomassa depende do tipo de fonte de carbono. Meios contendo glicose, isolada ou associada a frutose, disponibilizam fonte primária de carbono, que requer menor dispêndio energético metabólico para reprodução celular. Os meios cuja fonte de carbono é frutose ou glicerol exigem transformações moleculares para obtenção de glicose, o que consome energia celular e dificulta a produção de biomassa (ROSS *et al.*, 1998).

Embora o melhor aproveitamento da fonte de carbono para a produção de biomassa (Y_{xs}) tenha sido observado em meios com glicose, agitados a 200 rpm, o maior crescimento celular não ocorreu nessa velocidade de agitação como se observou na Figura 19.

Considerando que o fator de conversão de substrato em biomassa é resultado da relação entre a variação da quantidade de células e a variação da concentração de substrato no meio de cultura, o aumento de Y_{xs} na presença de aumento discreto do crescimento celular, aponta para queda do consumo de substrato a 200 rpm (Figura 19).

Efeitos sobre o consumo do substrato

A glicose, a mistura frutose+glicose e a frutose foram as fontes de carbono mais extensamente consumidas nas três velocidades de agitação. Glicose foi quase totalmente depletada do meio ao final do experimento em cultivo estático ($99,87 \pm 0,011\%$) e na velocidade de 100 rpm ($99,84 \pm 0,025\%$) (Figura 20 a).

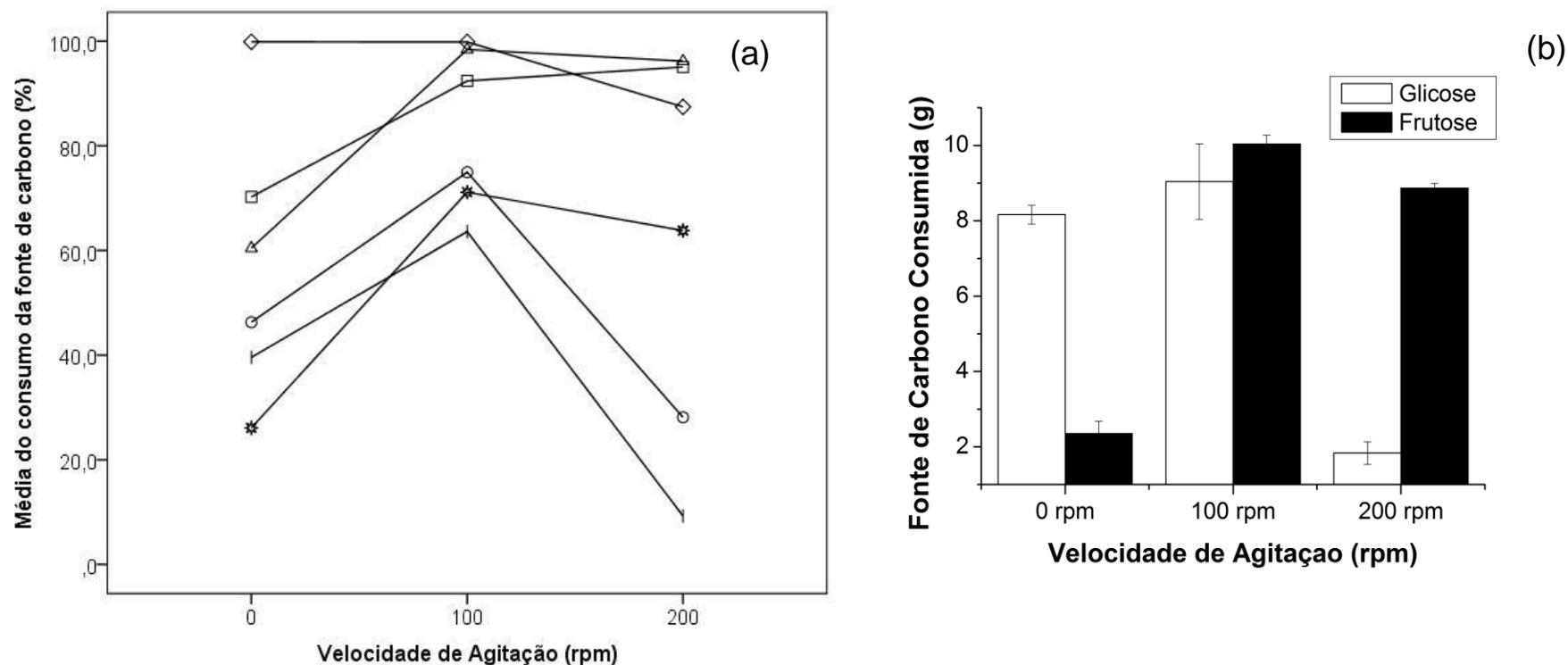
O aumento da velocidade de agitação para 100 rpm aumentou o consumo da mistura Fru+Gli ($98,39 \pm 0,11\%$) e, quando utilizados 200 rpm,

reduziu o consumo de glicose, mas aumentou o de frutose ($95,03 \pm 7,3\%$). Os demais substratos foram consumidos em sua maior extensão a 100 rpm, porém nenhum superou os 75% (Figura 20b). O consumo diferenciado destes substratos a 0 rpm e 200 rpm ratifica o efeito de interação entre os fatores testados, identificados nos cálculos dos efeitos.

As condições de agitação que estimulam o crescimento bacteriano promovem maior consumo do substrato e desfavorecem a produção de celulose. A elevadas velocidades de agitação, o meio apresenta maior eficiência de troca de gases e aporte de oxigênio dissolvido suficiente para suportar o maior crescimento bacteriano. Considerando a proposta de função ecológica da celulose para a bactéria como agente de flotação e maior contato com o oxigênio, o maior aporte de oxigênio dissolvido no meio reduz a necessidade de produção de celulose pela bactéria para mantê-la na interface líquido-ar, onde há maior disponibilidade de O_2 . Esta regulação da produção da produção de celulose em meios com disponibilidades diferentes de oxigênio envolve o sistema PDE / DGC (fosfodiesterase/diguanilato ciclase), que regula a concentração de c-di-GMP intracelular, responsável pela ativação da BcsA e, conseqüentemente regula a biossíntese da celulose. Este fato pode indicar também que a demanda do substrato para o crescimento celular é maior do que a demanda para a síntese do polímero, apesar de este ser constituído de unidades de glicose.

A análise do consumo de cada açúcar separadamente nos experimentos realizados com a mistura Fru+Gli a diferentes velocidades de agitação (Figura 20b) permite verificar que o maior consumo de glicose ocorreu no experimento em cultivo estático e com agitação a 100 rpm ($8,16 \pm 0,25\%$ e $9,04 \pm 1,00\%$, respectivamente), enquanto o maior consumo de frutose ocorreu sob agitação mais vigorosa ($10,04 \pm 0,23\%$, a 100 rpm, e $8,87 \pm 0,13\%$, a 200 rpm). Nos experimentos realizados em cultivo estático, o consumo de glicose foi 4,5 vezes maior do que o de frutose. No experimento realizado a 200 rpm, o consumo de frutose foi 3,8 vezes maior do que em cultivo estático (Figura 20b).

Figura 19. Relação entre velocidade de agitação em meios com diferentes fontes de carbono e média do consumo de substrato



Fonte: Dados da pesquisa

Legendas: (a) valores médios do consumo de diferentes fontes de carbono testadas a diferentes velocidades de agitação (desvios-padrão no texto);

(b) consumo de glicose e frutose nos experimentos com a mistura Fru+Gli como fonte de carbono a diferentes velocidades de agitação

Fontes de carbono: (O) Sacarose, (□) Frutose, (◇) Glicose, (Δ) Frutose + Glicose (Fru+Gli), (*) Glicerol, (l) Xilose.

A mistura Fru+Gli favoreceu tanto a produção de celulose quanto o crescimento da biomassa, possivelmente porque glicose foi um dos açúcares mais favoráveis à produção de celulose e frutose, mais favorável ao crescimento da biomassa.

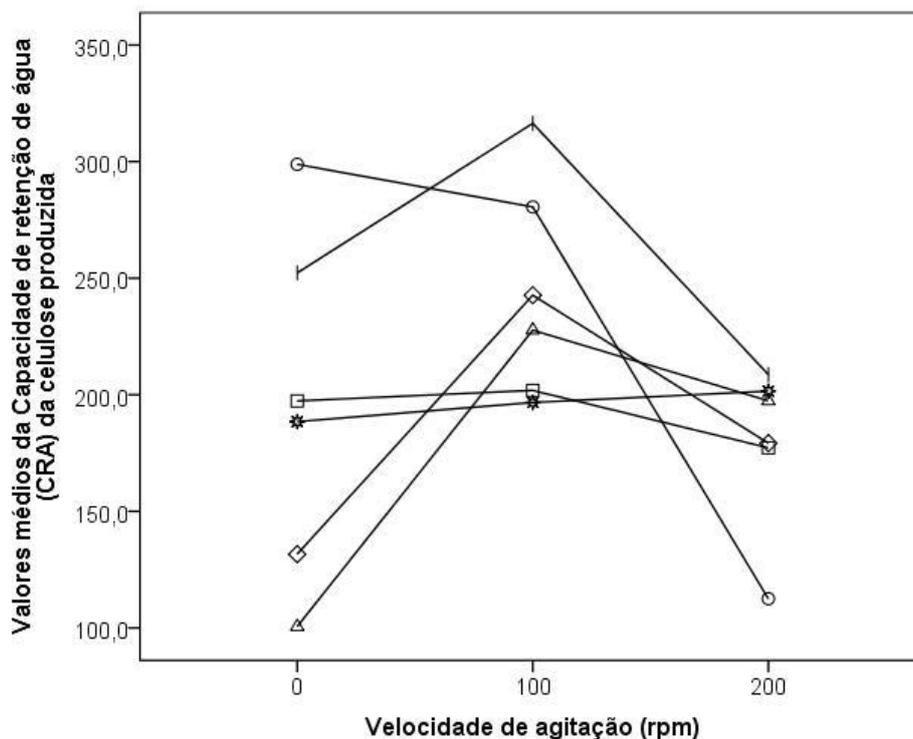
Efeitos sobre a capacidade de retenção de água da celulose

De maneira geral, a capacidade de retenção de água da celulose aumentou quando se aplicou a agitação de 100 rpm, exceto quando foi produzida nos meios com sacarose (Figura 21).

Houve diminuição da produção de celulose em todos os experimentos quando se aumentou a velocidade de agitação a mais que 100 rpm, exceto em meio com glicerol, com o qual houve elevação com o aumento da velocidade de agitação para 200 rpm. A influência diferenciada da velocidade de agitação sobre a capacidade de retenção de água da celulose produzida em meios com sacarose e com glicerol, em relação à observada para os demais substratos, evidencia o efeito de interação entre os fatores, mas, considerando a aplicação prática de celulose bacteriana, teve outro significado.

A capacidade de retenção de água da celulose é uma propriedade importante quando da utilização de tais membranas para engenharia de tecidos. Ocluir lesões com membranas com alto poder de retenção de água significa facilitar o processo cicatricial pela manutenção da hidratação celular, por contribuir com transportes moleculares e tissulares essenciais. No cultivo, alta capacidade de retenção de água favorece difusão de nutriente e, portanto, maior homogeneidade da membrana produzida (SVENSSON *et al.*, 2005).

Figura 20. Relação entre velocidade de agitação em meios com diferentes fontes de carbono e média da capacidade de retenção de água da celulose

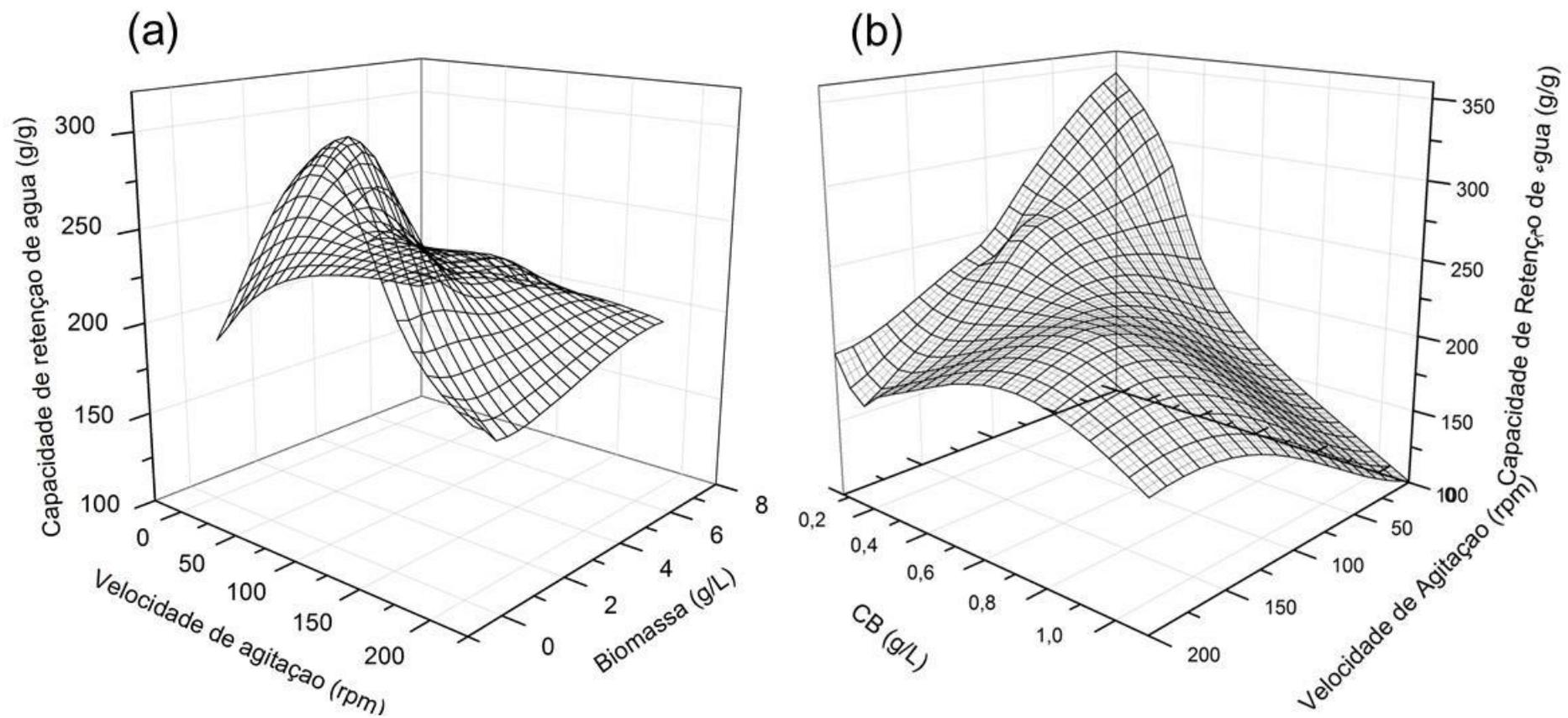


Fonte: Dados da pesquisa

Legendas: Fontes de carbono: (O) Sacarose, (□) Frutose, (◇) Glicose, (Δ) Frutose + Glicose (Fru+Gli), (*) Glicerol, (l) Xilose. Os desvios-padrão foram inseridos no texto, imediatamente após cada dado citado.

A capacidade de retenção de água da celulose produzida está relacionada à velocidade de agitação do frasco e também à quantidade de células no meio, como pode ser verificado na Figura 22. A velocidade de agitação de 100 rpm foi a mais favorável ao crescimento celular nas condições testadas, mas não à produção de celulose. No entanto a celulose produzida em experimentos realizados a essa velocidade de agitação apresentaram maior capacidade de retenção de água, tal como se verifica nas velocidades entre 50 rpm e 100 rpm.

Figura 21. Relação entre a velocidade de agitação, concentração de biomassa e de celulose com capacidade de retenção de água da celulose



Fonte: Dados da pesquisa

Legendas: (a) a quantidade de células no meio; (b) a quantidade de celulose produzida.

Estes resultados evidenciam a relação entre capacidade de retenção de água, número de unidades produtoras e quantidade de celulose produzida, de forma que menores quantidades de biomassa e de celulose produzida levam à maior capacidade de retenção de água.

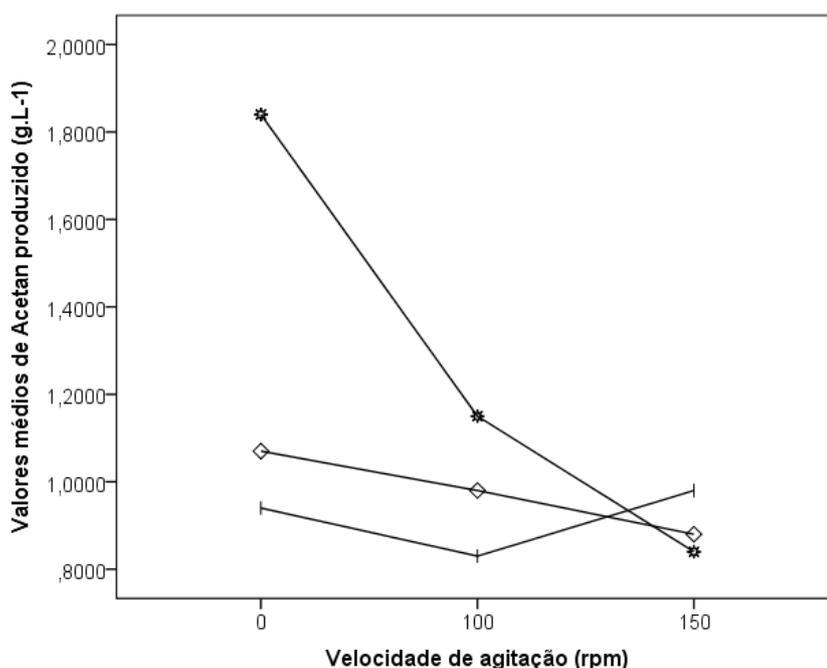
Um menor número de células produz quantidades menores de celulose, o que resulta em uma menor interação entre as cadeias, microfibrilas e fibrilas, que interagem em pequenas extensões, resultando em uma malha mais frouxa. É possível que a redução da capacidade de retenção de água com a elevação da velocidade de agitação seja explicada pelo efeito da maior força centrífuga sobre o polímero, que provavelmente força a aproximação das cadeias poliméricas, aumenta suas interações químicas, e promove sinérese. RUKA et al. (2012) verificaram que a agitação do meio provocou mudanças estruturais na celulose bacteriana formada e também a redução da espessura das fibrilas, o que pode justificar a menor retenção de água, já que fibrilas mais finas são capazes de interagir lateralmente com as outras, o que pode ter resultado em menor quantidade de hidroxilas disponíveis para a interação com moléculas de água.

A celulose obtida em meio de xilose a 100 rpm apresentou maior capacidade de retenção de água ($316,41 \pm 24,77$) (Figura 22), ou seja, podia reter quantidade de água equivalente a 316 vezes sua massa. Isto talvez tenha ocorrido porque os meios com esse substrato foram aqueles em que as células apresentaram maior dificuldade de crescimento, com reduzido consumo do substrato ($63,61 \pm 9,08$) e Y_{xs} ($0,084 \pm 0,07$). Em compensação, foram os que apresentaram maior $Y_{ps}(CB)$ ($0,19 \pm 0,19$). Nesse caso particular, eram poucas células produzindo celulose a uma velocidade mais elevada, e um pequeno número de cadeias mais longas resultando na formação de um gel com malha frouxa, em que havia maiores distâncias entre as fitas e, conseqüentemente, número maior de hidroxilas livres para interagir com as moléculas de água do meio, o que resultou na maior capacidade de retenção de água.

Efeitos sobre a produção de acetana

Maiores concentrações de acetana foram observadas em meios com glicerol e glicose (Figura 23).

Figura 22. Relação entre a velocidade de agitação, a fonte de carbono e os valores médios de acetana



Fonte: Dados da pesquisa

Legendas: Fontes de carbono: (◇) Glicose, (*) Glicerol e (|) Xilose. Os desvios-padrão foram inseridos no texto, imediatamente após cada dado citado.

A produção de acetana sofreu influência significativa da agitação ($p = 0,029$) e também da fonte de carbono ($p = 0,036$), mas não de interação entre os fatores ($p = 0,057$). Nas três velocidades de agitação em que foram realizadas as medidas de acetana, foi possível verificar que os meios que resultaram em maior produção deste polímero foram também aqueles em que houve maior crescimento da biomassa, o que não foi observado para a produção de celulose.

A produção de acetana está relacionada com a concentração de células. Isso pode decorrer de um maior número de células produzir mais UDP-Glicose (UDPGlc). Maior oferta desse nucleotídeo resulta em maior produção de acetana, o que explica maior relação da produção de acetana do que da

celulose com o crescimento celular. Ross *et al.* (1991) e Lee *et al.* (2014) afirmaram que, pelo fato de acetana e celulose serem produzidos a partir de UDPGlc, a produção de um polímero concorre com a do outro. Todavia Ishida *et al.* (2002) demonstraram a importância da presença de acetana para a produção de celulose por *G. xylinus*, provavelmente por influenciar na viscosidade do meio.

A maior produção de acetana foi observada em cultivo estático em meio com glicerol ($1,84 \pm 0,15 \text{ g.L}^{-1}$). A quantidade de acetana produzida reduziu com o aumento da velocidade de agitação do frasco até 150 rpm, nos meios com glicerol e glicose ($0,84 \pm 0,15 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,88 \pm 0,15 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente). No meio contendo xilose, a produção diminuiu até a velocidade de 100 rpm ($0,83 \pm 0,15 \text{ g.L}^{-1}$), e aumentou quando a velocidade de agitação foi alterada de 100 rpm para 150 rpm ($0,98 \pm 0,15 \text{ g.L}^{-1}$).

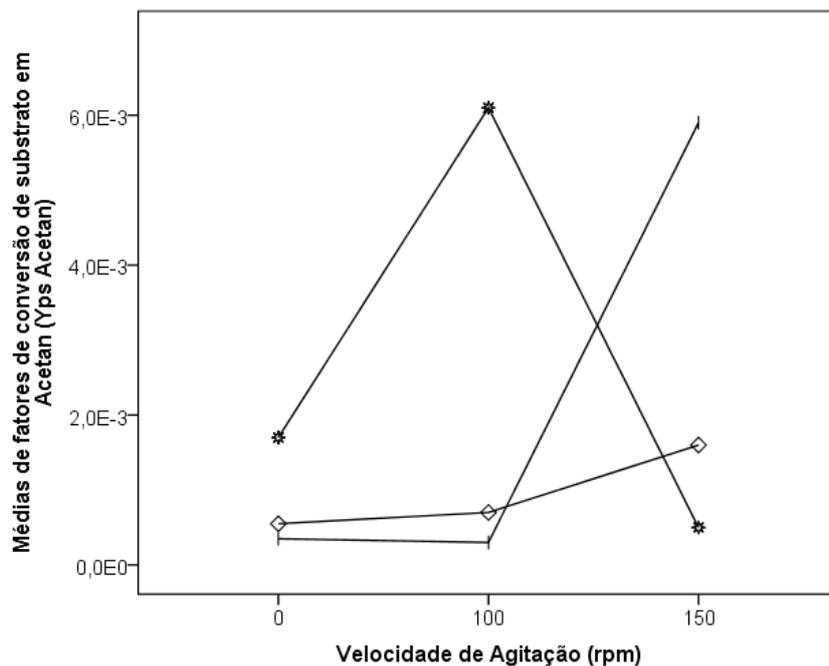
A redução na produção de celulose em meio de xilose (Figura 23) pode ser justificada pela redução do consumo de substrato em velocidades de agitação superiores a 100 rpm, porém o aumento da produção de acetana nas mesmas condições pode ser explicado pelo direcionamento da xilose consumida para a produção de acetana, refletida pela maior $Y_{ps}(\text{acetana})$ ($0,006 \pm 0,00$) (Figura 24).

O aumento da velocidade de agitação provavelmente provoca a redução da viscosidade do meio, uma vez que este é um fluido pseudoplástico. A maior produção de acetana pela bactéria a velocidades superiores a 100 rpm é uma forma de compensar a queda na viscosidade do meio, uma vez que é um polissacarídeo estruturalmente muito semelhante à xantana, um dos principais agentes de viscosidade conhecidos e já usado industrialmente (JANSSON *et al.*, 1993; SEMINO e DANKERT, 1993; OJINAKA *et al.*, 1996).

Ainda não se conhecem tantas aplicações para o acetana quanto para a celulose, porém se sabe que a produção desse polissacarídeo solúvel é necessária à produção de celulose por *G. xylinus*, o que Ishida *et al.* (2002) comprovaram ao identificarem que a produção de celulose foi consideravelmente reduzida quando a produção de acetana pela bactéria foi comprometida pela inativação do gene *aceA*, responsável pela primeira etapa da biossíntese de acetana. O fato de a produção de acetana e de celulose

terem sido maiores nos experimentos realizados em cultivo estático, reduzindo-se com o aumento da velocidade de agitação, reflete essa relação entre a produção dos dois polímeros e indica que se o objetivo for produzir acetana, a velocidade de agitação do meio precisa ser considerada além da fonte de carbono (IANNINO et al. 1988).

Figura 23. Relação entre a velocidade de agitação, tipo de fonte de carbono e média dos fatores de conversão de substrato em acetana



Fonte: Dados da pesquisa

Legendas: Fontes de carbono: (◇) Glicose, (*) Glicerol e (l) Xilose. Os desvios-padrão foram inseridos no texto, imediatamente após cada dado citado.

Efeitos sobre o pH final do meio de produção

O pH final do meio de produção foi consideravelmente diferente segundo a fonte de carbono. O pH final do experimento com meio formulado com glicerol apresentou-se maior que 6,0 ($6,21 \pm 0,01$) apesar de haver atividade metabólica com crescimento celular e produção de celulose e acetana. Por outro lado, os valores de pH dos caldos com glicose e xilose tornaram-se consideravelmente ácidos, com valores inferiores a 4,0, em todas as velocidades de agitação testadas.

O pH com glicerol foi tão mais ácido quanto maior a velocidade de agitação, variando de $6,21 \pm 0,01$ até $5,56 \pm 0,02$. Em meio com xilose, o pH diminuiu de $3,82 \pm 0,06$ para $3,66 \pm 0,03$, com o aumento da velocidade de agitação de 0 rpm para 100 rpm, mas não sofreu alterações com o aumento da velocidade de 100 rpm para 150 rpm. Nos meios com glicose, não houve diferença entre o pH final do caldo produzido em cultivo estático e a 100 rpm ($3,59 \pm 0,08$), porém, a 150rpm, o pH ficou mais ácido ($3,31 \pm 0,02$) do que nas demais condições de agitação. A variação desigual do pH dos diferentes meios com a velocidade de agitação evidencia o efeito de interação entre os fatores sobre essa variável dependente.

A intensa acidificação dos meios de glicose e xilose durante a fermentação pode ser atribuída à produção dos ácidos glucônico e xilônico, respectivamente. Não foi observada acidificação do meio com glicerol. Tal resultado também foi observado por Keshk & Sameshima, em 2005, quando verificaram que, além de glicose e xilose, apenas no meio com etanol era observada essa acidificação. Nos meios com os demais substratos testados, não se observou redução significativa de pH.

A produção de celulose não está relacionada à queda do pH do meio (TODA *et al.*, 1997; KESHK, SAMESHIMA, 2005) e por isso deve-se considerar a possibilidade de a produção eficiente de celulose pela bactéria, a partir das diferentes fontes de carbono, residir em sua capacidade de sintetizar glicose-6P a partir de diferentes substratos de carbono e polimerizá-la formando celulose. Para cada fonte de carbono, deve-se considerar a capacidade de absorção da molécula íntegra ou a necessidade de conversão anterior, cada etapa da bioconversão até a síntese gliceraldeído-3P ou outro intermediário, como oxaloacetato, e o direcionamento deste intermediário para a via de produção de glicose-6P, que será polimerizada para a produção de celulose (DONINI *et al.*, 2010; ROSS, 1991).

A análise conjunta das influências dos substratos e da velocidade de agitação sobre os produtos formados tornou possível agrupar os substratos e as velocidades de agitação em subgrupos com homogeneidade de médias ($p=0,05$), como pode ser verificado no Quadro 3. Neste, a numeração atribuída

ao grupo é tão maior (mas não proporcional), quanto mais favoráveis foram as condições à intensidade da variável dependente.

A compilação dos níveis dos fatores substrato e velocidade de agitação de acordo com a forma com que influenciam cada uma das variáveis dependentes avaliadas nesse estudo podem ser utilizadas como guia para a escolha das condições mais adequadas à produção de celulose ou de acetana em meios contendo os diferentes substratos testados. Pode ser útil também quando não for possível escolher a matéria-prima, como no caso da necessidade de aproveitamento de resíduos industriais. Além disso, pode ser o ponto de partida para um grande número de novos estudos sobre os mecanismos em comum pelos quais os grupos de fontes de carbono influenciam de forma diferente cada variável dependente.

Em resumo, foram observados efeitos de interação significativos ($p < 0,05$) da fonte de carbono e da velocidade de agitação (FC * VA) sobre: quantidade de celulose produzida, crescimento da biomassa, consumo do substrato, capacidade de retenção de água, fatores de conversão do substrato em biomassa (Y_{xs}) ou em acetana ($Y_{ps(\text{acetana})}$) e pH.

A produção de acetana e o fator de conversão de substrato em celulose ($Y_{ps(\text{CB})}$) sofreram influência da fonte de carbono e da velocidade de agitação, mas não da interação entre esses fatores ($p > 0,050$).

De acordo com a análise exibida no Quadro 3, as influências das fontes de carbono sacarose e glicose foram significativamente diferentes sobre a produção de celulose, bem como as velocidades 100 rpm e 200 rpm influenciaram de maneira significativamente diferente das velocidades 0 rpm e 150 rpm. O mesmo raciocínio se aplica às demais variáveis dependentes analisadas.

Quadro 3. Agrupamento dos níveis testados para as variáveis Independentes que influenciaram significativamente as variáveis dependentes, segundo homogeneidade de médias (Turkey $\alpha=0,05$)

		Variáveis Dependentes									
		CB produzida (g.L ⁻¹)	Crescimento da biomassa (g.L ⁻¹)	Consumo de substrato (g.L ⁻¹)	CRA	Yxs	Yps CB	Yps acetana	pH		
Variáveis Independentes	Fonte de carbono	Subconjuntos	1	Sacarose	Sacarose glicose glicerol xilose	Sacarose Glicerol Xilose	Frutose Glicose Fru+Gli	Sacarose Frutose Glicose Fru+gli Glicerol Xilose	Sacarose Frutose Fru+gli	Glicose	Glicose
		2	Glicose	Frutose Fru+gli	Frutose Glicose Fru+Gli	Xilose		Glicose Xilose	Glicerol	Glicerol	
		3								Xilose	
	Velocidade de agitação (rpm)	Subconjuntos	1	100 200	0 150	150	200	0 150	0 100 200	0	150
		2	0 150	100	0 100 200	100	100	100	150	100 150	0
		3					200				

Fonte: Dado da Autora

É certo que os fatores localizados em cada grupo influenciam a variável dependente (neste caso, a celulose produzida) de maneira significativamente diferente. Neste, tem-se reunidos em grupos diferentes os níveis de cada fator que influenciam diferentemente cada resposta.

5.2 PURIFICAÇÃO DAS MEMBRANAS DE CELULOSE

Uma vez identificadas diferentes fontes de produção de celulose, buscou-se investigar o processo de sua purificação, empregando diversas concentrações de NaOH, combinadas a diferentes tempos de aquecimento em forno de micro-ondas.

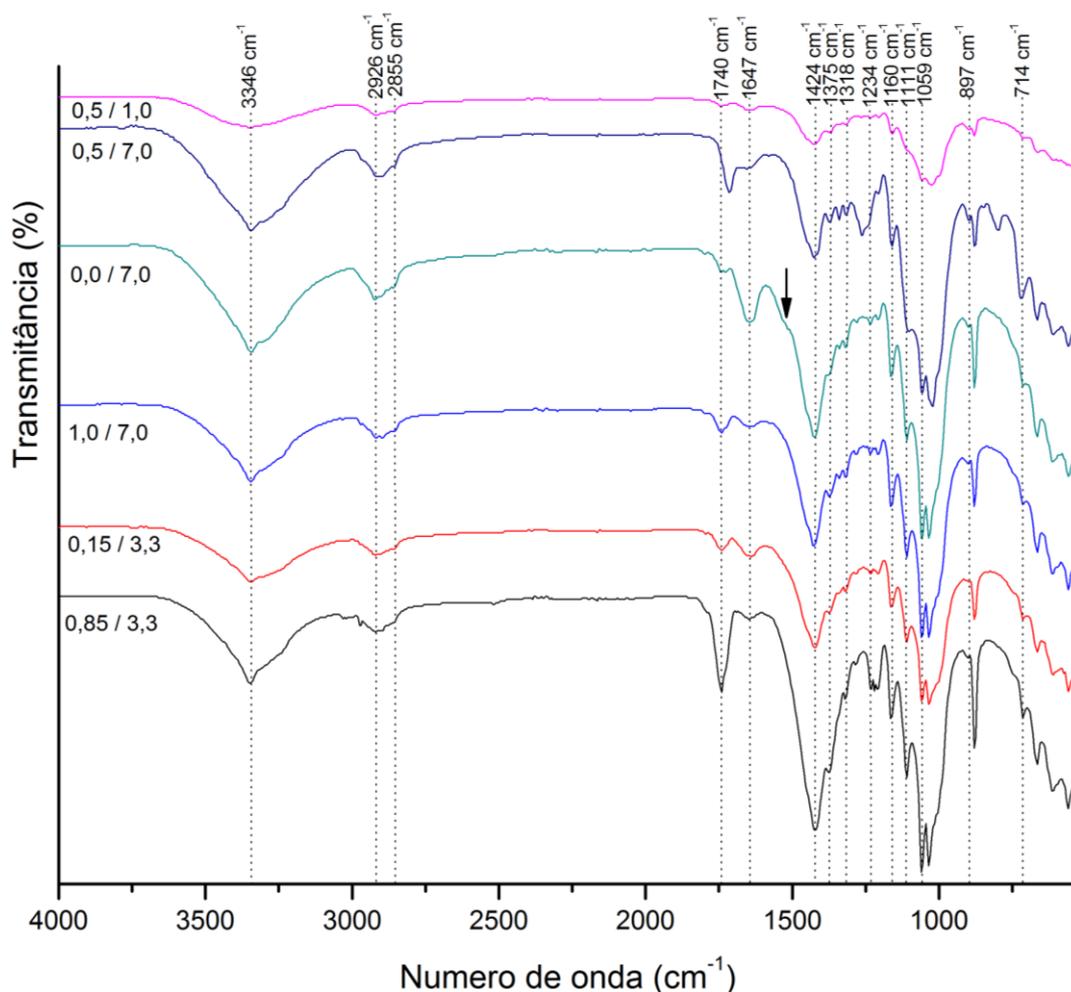
Efetividade da purificação

A purificação desejada para as membranas de celulose corresponde ao tratamento capaz de remover as células e todos os seus resíduos, sem que comprometer estruturalmente o polímero. Para tal verificação é necessário o reconhecimento e a verificação da presença das bandas de absorção características da celulose, bem como a ausência das bandas características de moléculas biológicas, como proteínas.

Nos espectros exibidos na Figura 25 foi possível identificar bandas de absorção características da celulose. As bandas com frequências de 897 cm^{-1} , 1059 cm^{-1} e 1111 cm^{-1} são referentes às vibrações axiais das ligações C-O e angulares de C-H. As bandas de vibração angular de C-H, O-H ou CH₂, corresponderam às frequências de 1234 cm^{-1} e 1318 cm^{-1} . As bandas de deformação angular simétrica de CH₂, caracterizadas pela frequência em 1435 cm^{-1} , parecem ter correspondido à frequência de 1424 cm^{-1} , identificada nesta pesquisa, possivelmente pelas fortes interações de van der Waals entre os anéis glicosídicos.

Outras bandas características da celulose, identificadas neste estudo, foram a $3346\text{ cm}^{-1} \pm 3\text{ cm}^{-1}$, que corresponde de deformação axial de ligações O-H; a $2855 \pm 10\text{ cm}^{-1}$, associada a deformações axiais simétricas da ligação C-H de grupos metileno, como também a $2926 \pm 10\text{ cm}^{-1}$, das deformações axiais assimétricas do mesmo grupamento.

Figura 24. Espectros FT-IR de amostras de celulose submetidas a diferentes tratamentos com NaOH e aquecimento em forno de micro-ondas



Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: 0,5 / 1,0- amostra tratada com solução de NaOH a 0,5 mol.L⁻¹ e 1,0 min de aquecimento em forno micro-ondas; 0,5 / 7,0- amostra tratada com solução de NaOH a 0,5 mol.L⁻¹ e 7,0 min de aquecimento em forno micro-ondas; 0,0 / 7,0- amostra tratada com água destilada e 7,0 min de aquecimento em forno micro-ondas; 1,0 / 7,0- amostra tratada com solução de NaOH a 1,0 mol.L⁻¹ e 7,0 min de aquecimento em forno micro-ondas; 0,15 / 3,3- amostra tratada com solução de NaOH a 0,15 mol.L⁻¹ e 3,3 min de aquecimento em forno microondas; 0,85 / 3,3- amostra tratada com solução de NaOH a 0,85 mol.L⁻¹ e 3,3 min de aquecimento em forno microondas

Foram identificadas ainda frequência a $1740 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$, de deformação axial de carbonilas aldeídicas dos grupos redutores terminais das cadeias de celulose; a 2855 cm^{-1} , de deformação axial de ligações C-H aldeídico; $1375 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$, de deformação angular das ligações C-H do grupo metila, e 1160 cm^{-1} , de deformação axial assimétrica C-O-C. Quanto à deformação angular C-CH₂, identificou-se frequência em 714 cm^{-1} , admitindo que a redução na frequência característica, que se iguala a $720 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$, possivelmente decorreu da

interação entre o grupamento CH_2 e as regiões apolares dos anéis próximos. O incremento desses picos esteve diretamente relacionado ao aumento do percentual dos componentes celulósicos (SAIN & PANTHAPULAKKAL, 2006; SILVERSTEIN, 2007; ALEMDAR & SAIN, 2008; SASKA *et al.*, 2011).

Para a verificação da presença ou ausência de células nas membranas, procedeu-se à busca de bandas de absorção referentes aos grupos funcionais de amidas, amins e fosfato, presentes em proteínas e fosfolipídeos, porém ausentes na celulose:

- Amidas em estado sólido apresentam dois sinais característicos correspondentes aos grupos funcionais amida I e amida II. A frequência da amida I, entre 1640 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} , tem forte intensidade e corresponde à deformação axial $\text{C}=\text{O}$. Para a amida II, existem bandas agudas, que correspondem à deformação angular de NH_2 ou de NH com frequências situadas entre 1655 cm^{-1} e 1620 cm^{-1} , com intensidade equivalente a metade a um terço da banda de amida I. Esses grupamentos em estado sólido também são caracterizados pela presença de uma banda de deformação axial $\text{C}-\text{N}$, em 1400 cm^{-1} e uma banda média e larga entre 800 cm^{-1} e 666 cm^{-1} . Observe-se que todas as bandas características de amidas estiveram ausentes em todos os espectros analisados.
- Amins de aminoácidos apresentam uma banda larga e intensa, de deformação axial NH_3^+ , com frequência entre 3100 cm^{-1} e 2600 cm^{-1} , que se estende até cerca de 2000 cm^{-1} . Apresentam também uma banda fraca, de deformação angular assimétrica de NH_3^+ , entre 1660 cm^{-1} e 1610 cm^{-1} e uma outra, relativamente forte, de deformação angular simétrica entre 1550 cm^{-1} e 1485 cm^{-1} . O grupo carboxilato absorve fortemente entre 1600 cm^{-1} e 1590 cm^{-1} e, fracamente, em 1400 cm^{-1} . Todavia nenhuma das bandas características de espectros de aminoácidos esteve presente em qualquer dos espectros das membranas de celulose tratadas (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).
- Bandas nas frequências de 1093 cm^{-1} , 1020 cm^{-1} , 962 cm^{-1} , e $570\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ são características de modos vibracionais de grupos fosfato (SASKA *et al.*, 2011). Silverstein *et al.* (2007) também se referem a bandas de deformação axial $\text{P}-\text{O}-\text{P}$, na frequência de 1000 cm^{-1} a 870 cm^{-1} e, uma fraca, a

aproximadamente 700 cm^{-1} . Nenhuma dessas bandas foi encontrada nos espectros das membranas purificadas.

A identificação de uma banda em 1647 cm^{-1} , característica de celulose, é relativa à vibração angular da ligação O-H de moléculas de água adsorvidas ao polímero (ALEMDAR e SAIN, 2008; SASKA *et al.*, 2011). Esta banda apresentou maior intensidade no espectro de membrana purificada com aquecimento em forno de micro-ondas, porém sem NaOH, conforme se identifica no espectrograma (Figura 25). O aumento da intensidade pode ter resultado da superposição de bandas de vibração axial da hidroxila da água adsorvida; de carbonilas que realizam ligações de hidrogênio e de amidas residuais não removidas.

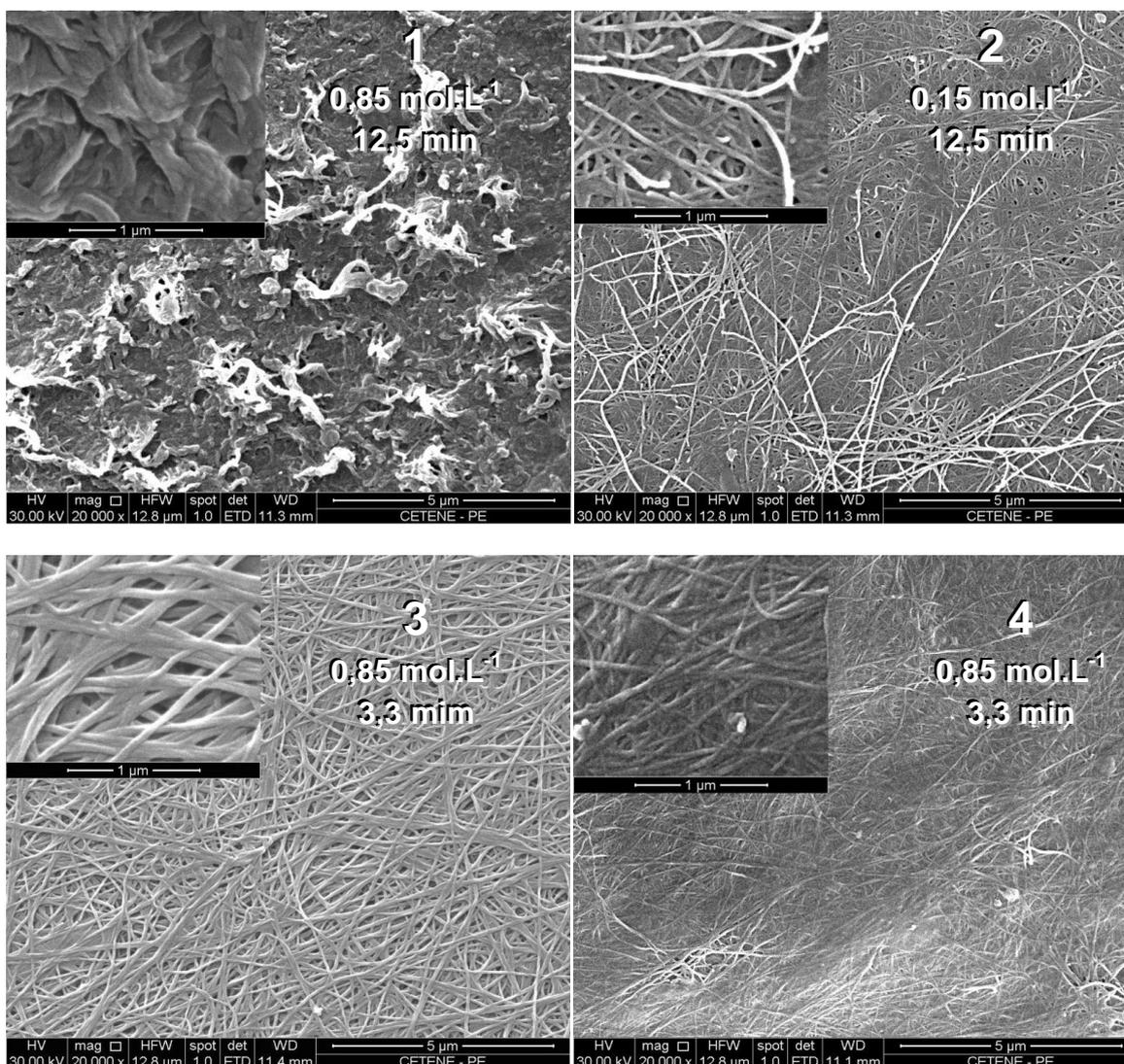
Além da banda de vibração das hidroxilas da água, os espectros da celulose apresentam também uma banda de absorção a $1730 \pm 10\text{ cm}^{-1}$, correspondente ao deslocamento da banda de deformação axial C=O das carbonilas aldeídicas. Dessa forma, podem ocorrer ligações entre carbonilas e hidrogênio de hidroxilas de carbonos próximas, o que pode resultar na redução da frequência de absorção devido à restrição de vibração da carbonila. A existência de tais ligações pode justificar o aumento do comprimento da ligação e a redução da frequência de vibração para 1647 cm^{-1} .

A análise das imagens das membranas por MEV permitiu a verificação da efetividade de cada tratamento, bem como a indicação de mudanças estruturais consideráveis na celulose bacteriana, confirmada pelas demais análises. As imagens estão agrupadas de maneira a facilitar a discussão dos resultados (Figuras 26 e 27).

As membranas 1 e 2 foram aquecidas durante o mesmo tempo em forno micro-ondas (12,7 min), porém submersas em soluções com concentrações consideravelmente diferentes de NaOH ($0,85\text{ mol.L}^{-1}$ e $0,15\text{ mol.L}^{-1}$, respectivamente). Da mesma forma, as membranas 3 e 4 foram submetidas a 3,3 min de aquecimento e concentrações de NaOH de $0,85\text{ mol.L}^{-1}$ e $0,15\text{ mol.L}^{-1}$, respectivamente. Comprovou-se, por microscopia eletrônica de varredura, em alto vácuo, a efetividade da ação do tratamento com NaOH e tempos de aquecimento testados, já que as membranas 1 a 4 apresentaram-se

limpas, com quantidades reduzidas ou ausência de impurezas nas suas superfícies (Figura 26).

Figura 25. Imagens de MEV alto vácuo das superfícies das membranas purificadas com diferentes concentrações de NaOH e tempos de aquecimento

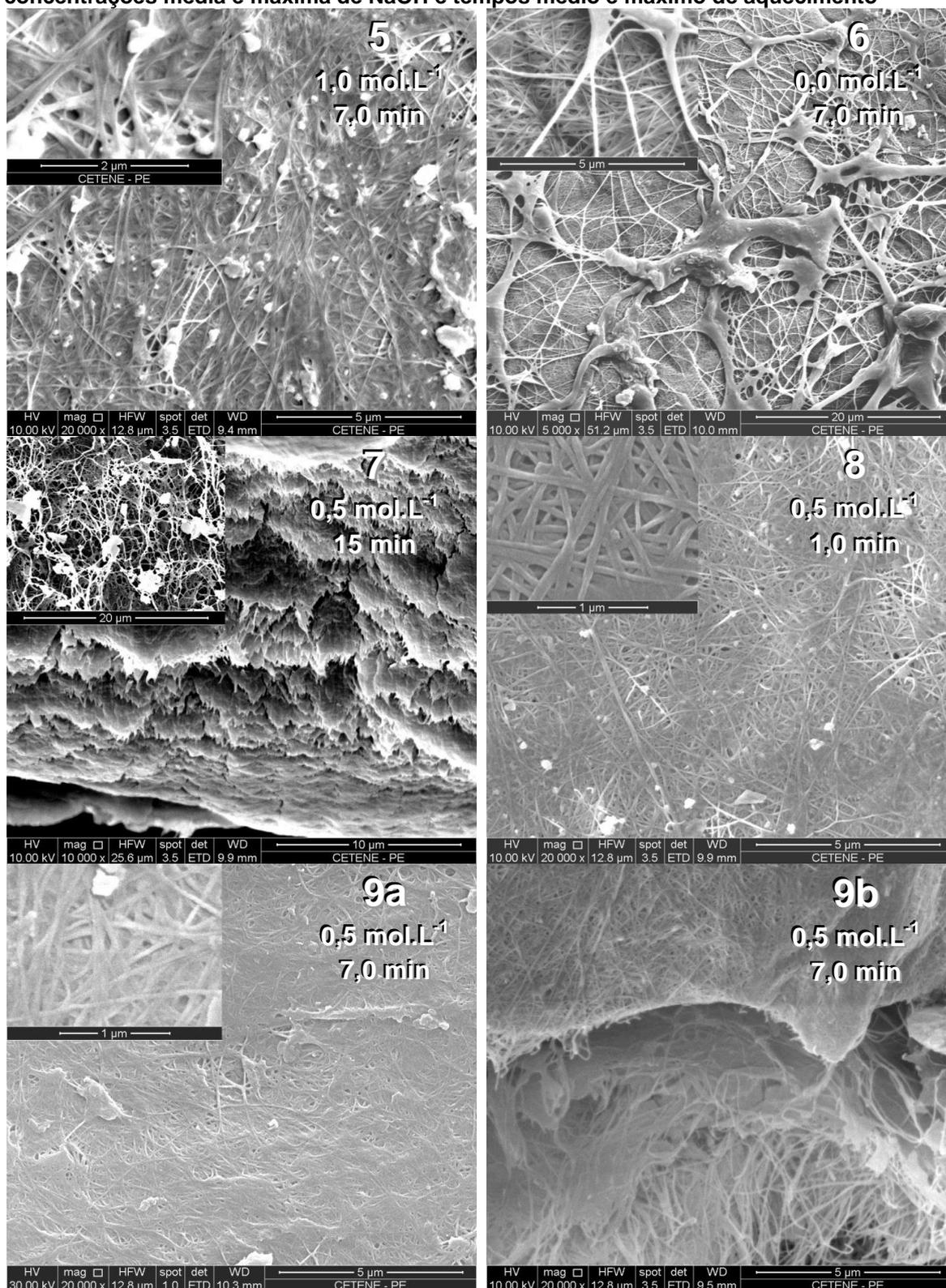


Fonte: Dados da pesquisa

Legendas: (1) NaOH a $0,85 \text{ mol.L}^{-1}$ e aquecimento por 12,7 min; (2) NaOH a $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ e aquecimento por 12,7 min; (3) NaOH a $0,85 \text{ mol.L}^{-1}$ e aquecimento por 3,3 min; (4) NaOH a $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ e aquecimento por 3,3 min

Raciocinando que foram empregados tempo longo (12,7 min) e tempo curto (3,3 min), assim como concentração alta ($0,85 \text{ mol.L}^{-1}$) e baixa ($0,15 \text{ mol.L}^{-1}$) de NaOH, com resultados semelhantes sobre a purificação, admitiu-se testar esse processo combinando a média a valores máximos de ambos os parâmetros, cujos resultados se observa na Figura 27.

Figura 26. Imagens de MEV alto vácuo das superfícies das membranas purificadas a concentrações média e máxima de NaOH e tempos médio e máximo de aquecimento



Legendas: (5) NaOH a 1 mol.L^{-1} e aquecimento por 7 min; (6) água destilada e aquecimento por 7 min; (7) NaOH a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e aquecimento por 15 min; (8) NaOH a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e aquecimento por 1 min; (9a) NaOH a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e aquecimento por 7 min (superfície); (9b) NaOH a 1 mol.L^{-1} e aquecimento por 7 min (borda).

Na membrana 6, em que água destilada foi usada em substituição à solução de NaOH, não foram visualizadas células, porém é possível que material presente na sua superfície corresponda a pequenas quantidades de restos celulares fundidos junto às fitas de celulose. A membrana 5, tratada sob mesmo tempo de aquecimento, porém em solução de NaOH a 1 mol.L^{-1} , foi a que apresentou maior concentração de partículas não identificadas na superfície, possivelmente resíduos de NaOH ou produtos da reação deste com os restos celulares não removidos durante as sucessivas lavagens com água destilada e cujos grupos funcionais não puderam ser identificados por espectrometria por infravermelho. As demais membranas foram purificadas com NaOH em concentrações menores e também com menor tempo de aquecimento, ensejando purificação com boa remoção de restos celulares e partículas não identificadas.

A observação desse conjunto de membranas indicou a importância do uso do álcali para a dissolução das impurezas e do aquecimento para remoção efetiva das mesmas. Soluções muito diluídas não removeram impurezas efetivamente e as mais concentradas pareceram fixá-las; o aquecimento por tempo excessivo provocou alterações estruturais mais acentuadas na celulose que mereceram análise mais detalhada.

Modificações estruturais nas membranas de celulose

A membrana 1, tratada com NaOH a $0,85 \text{ mol.L}^{-1}$, apresentou fitas contorcidas, partidas e parcialmente fundidas às outras em estruturas semelhantes a escamas, como se observa na imagem em detalhe (Figura 26), de maneira que não foi possível identificar a continuidade de nenhuma delas na trama, porém se puderam visualizar alguns poros remanescentes. A membrana 2 apresentou-se com estrutura preservada, mas com as fitas mais superficiais partidas e consideravelmente contorcidas. Parte dos poros foi ocluída, possivelmente pela fusão das fitas. As membranas 3 e 4 também foram submetidas às concentrações de $0,85 \text{ mol.L}^{-1}$ e $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaOH e aquecimento ao micro-ondas durante 3,3 min, portanto bem menor do que o das membranas 1 e 2. A membrana 3 apresentou-se com poros preservados e

fitas bem definidas e mais espessas do que as da membrana 4, assemelhando-se à celulose nanofibrilada, de origem vegetal, como observado por Lee *et al.* (2012).

Na membrana 6, aparentemente, houve dissolução ou fusão da camada superficial, abaixo da qual encontrou-se a trama aparentemente conservada e característica da celulose. É possível que o material com aparência diferenciada na camada superficial da membrana seja composto por uma mistura de ácidos nucleicos e proteínas que desnaturaram com o calor e se mantiveram aderidos à superfície ou que tal camada, mais exposta ao álcali e ao calor, tenha sofrido modificações estruturais que resultaram na fusão das fitas mais superficiais.

A membrana 5, entretanto, submetida ao mesmo tempo de aquecimento, mas com a concentração maior de álcali dentre as testadas, não apresentou esta camada superficial, mas a trama pareceu ser mais fechada, com as fitas interagindo em maiores extensões e muitas partículas na superfície.

Comparando-se a morfologia das membranas 7 e 8, tratadas com a mesma concentração de NaOH (0,5M), mas com tempos bem diferentes de aquecimento ao micro-ondas (15' e 1', respectivamente), foi possível notar como o tempo de aquecimento influenciou a remoção das impurezas e a estrutura da celulose.

A imagem do filme 7 corresponde à borda da membrana, onde se nota a substituição de estrutura fibrosa característica por uma que se assemelha a uma massa homogênea, possivelmente resultante da fusão ou dissolução das fitas, provocada pelo maior tempo de aquecimento a que a celulose foi submetida. Pode-se notar também que a celulose estava dividida em camadas, bem como havia parte da superfície lisa, acima da borda cortada. No detalhe, tem-se a imagem de uma das regiões da superfície, em que se percebem poucos pontos de interação entre as fitas, as quais se apresentavam contorcidas, contribuindo para uma estrutura extremamente porosa.

O filme 8, submetido a menor tempo de aquecimento que o filme 7, apesar de não estar isento de impurezas em sua superfície, teve sua estrutura preservada, com fitas espessas, claramente definidas e poros aparentes.

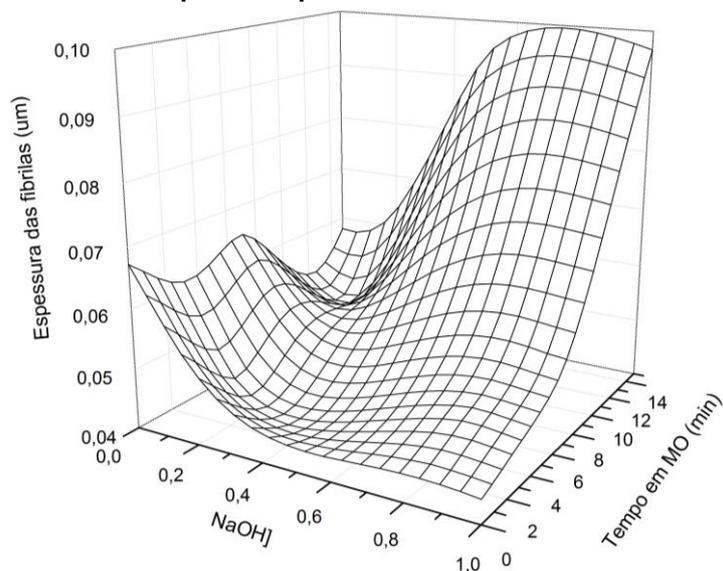
Comparando-se as tramas das membranas 5, 9 e 8, pode-se verificar que apesar de a 8 apresentar maior quantidade de partículas não identificadas em sua superfície, tinha os poros visivelmente descobertos, enquanto nas outras duas não foi possível a visualização dessas estruturas, pois a superfície apresentava fitas com estrutura diferenciada e poros ocluídos.

Ao testar o efeito da variação da concentração de NaOH, do tempo de aquecimento em micro-ondas e da interação entre os fatores sobre a espessura das fitas das membranas de celulose, segundo tratamentos a que foram submetidas, identificou-se associação significativa ($p < 0,001$).

A influência dos fatores e da interação entre os mesmos pode ser observada na representação gráfica 3D da Figura 28. O efeito de interação entre os fatores fica bastante evidente ao se observar a variação da espessura com a mudança dos níveis de ambos os fatores. A variação da espessura em função da concentração de NaOH permite verificar que a espessura das fitas diminuiu com o aumento da concentração de hidróxido de sódio quando foram testados os menores tempos de aquecimento, porém quando o tempo de aquecimento foi elevado, o aumento da concentração de NaOH sobre a espessura das fitas de celulose mostrou-se contrário e mais pronunciado. A observação em função do tempo de aquecimento em microondas confirma a influência de ambos os fatores e a interação, pois influencia a espessura das fitas de maneira diferente, dependendo da concentração de NaOH utilizada. Em concentrações superiores a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, a espessura das fitas aumenta com o aumento do tempo de aquecimento, porém, quando soluções com concentrações inferiores a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ foram utilizadas, o aumento do tempo de aquecimento resultou na alternância da variação da espessura das fitas, a qual foi mais acentuada em soluções mais diluídas da base.

O ponto em que a combinação da concentração de NaOH e do tempo de aquecimento resulta na elevação máxima da espessura das fitas não pôde ser verificado nesse planejamento, porém o gráfico de superfície aponta para concentrações mais elevadas de NaOH e maiores tempos de aquecimento. O aumento da espessura das fitas de celulose reflete o afastamento das cadeias do polissacarídeo, com possível modificação estrutural.

Figura 27. Variação da espessura das fitas de celulose após tratamentos com diferentes concentrações de NaOH e tempos de aquecimento em micro-ondas

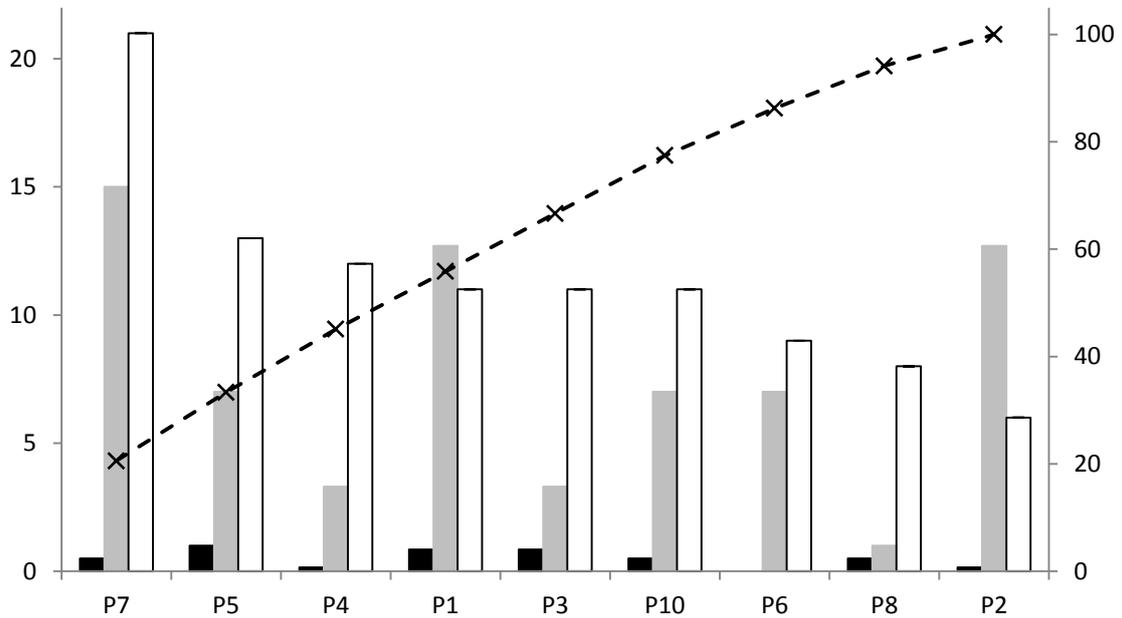


Fonte: Dados da pesquisa

Efeito sobre a capacidade de retenção de água das membranas

O efeito de interação entre os fatores concentração de NaOH e tempo de aquecimento em forno de micro-ondas foi significativo sobre a capacidade de retenção de água (CRA) das membranas, o que pode ser verificado na Figura 29. Ou seja, a CRA não foi influenciada por qualquer dos fatores testados de maneira independente, nos níveis avaliados, porém a mudança de níveis de um dos fatores influenciou a CRA, na dependência do valor do segundo fator. O diagrama de Pareto permite verificar que o aumento da CRA das membranas, com as combinações de fatores testadas se apresentou muito próximo da linearidade, de maneira que a variação de CRA entre cada condição testada mostrou-se muito próxima da regularidade.

Figura 28. Diagrama de Pareto da variação da capacidade de retenção de água da membrana de celulose em concentrações de NaOH em função dos tempos de aquecimento em microondas

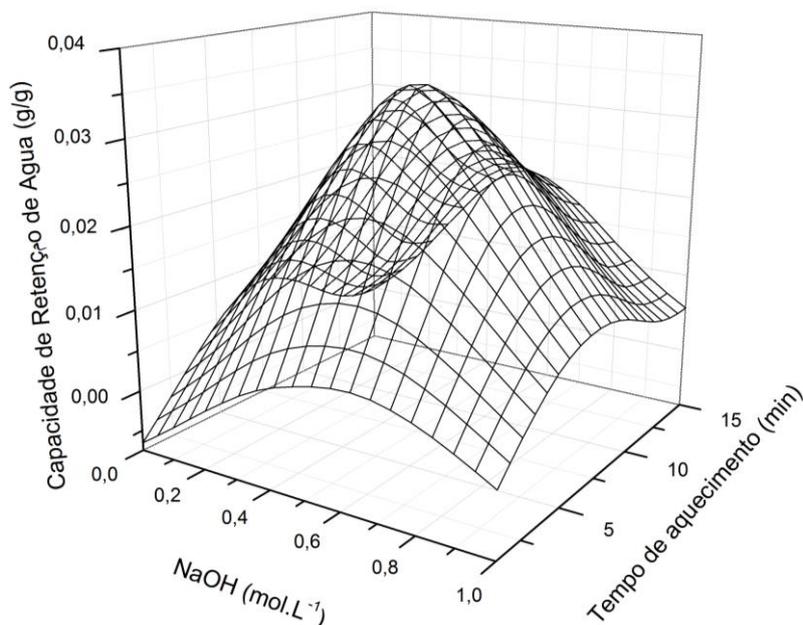


Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: . P10 representa a média dos resultados dos filmes P9 a P11; (■) [NaOH] (g.L⁻¹), (■) Tempo em forno microondas (min), (□) CRA (g/g) x 1000 e (---X---) Frequência (%) acumulada.

No gráfico de superfície (Figura 30) foi possível identificar o ponto de máxima CRA da membrana na faixa de níveis selecionados para este planejamento experimental e confirmou a observação sobre os efeitos dos fatores testados e sua interação sobre essa resposta.

Figura 29. Influência da concentração de NaOH e do tempo de aquecimento em micro-ondas sobre a capacidade de retenção de água da celulose bacteriana.



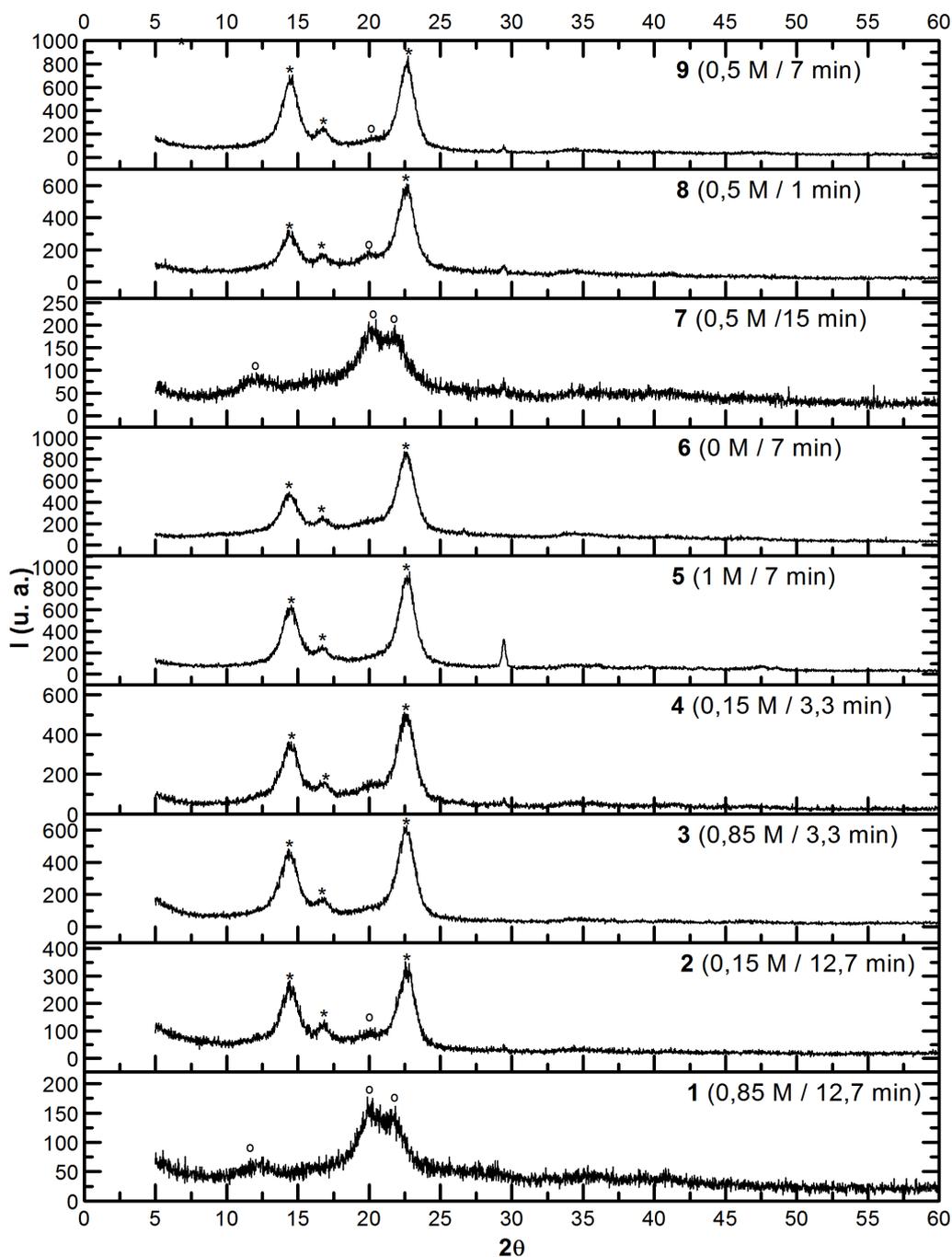
Fonte: Dados da pesquisa

A CRA variou com ambos os fatores, de tal forma que a membrana com a maior CRA (de 0,032) foi produzida em solução de NaOH 0,5 mol.L⁻¹ e aquecida em forno micro-ondas por 7 minutos, condição do ponto central do planejamento fatorial feito para esses testes. A celulose submetida a estes tratamentos, portanto têm a capacidade de manter maior número de hidroxilas livres para interagirem com reagentes ou outras substâncias químicas presentes, por meio de ligações de hidrogênio ou reações com substâncias eletrofílicas e ainda reterem moléculas de água em sua trama.

Efeito sobre a cristalinidade da celulose

A seguir são apresentados os difratogramas de todas as membranas submetidas a cada um dos métodos testados (Figura 31).

Figura 30. Difratogramas das membranas de celulose submetidas a diferentes condições de purificação de acordo com planejamento fatorial 2².



Fonte: Dados da pesquisa

Legendas: Os picos destacados com asterisco (*) são característicos de celulose I e os destacados com um círculo (o) são característicos de celulose II

Dentre os tratamentos realizados, os das membranas 1 e 7 foram os cuja celulose I foi completamente convertida em celulose II uma vez que, diferente das membranas submetidas aos demais tratamentos, essas apenas

apresentam picos característicos de celulose II e nenhum de celulose I. Os difratogramas apresentam-se difusos, indicando a amplitude das regiões amorfas, confirmando o que foi hipotetizado ao visualizar ambas as membranas por MEV. As membranas submetidas aos tratamentos 3, 4, 5 e 6 apresentaram apenas picos de celulose I, mas não de celulose II, porém os difratogramas das demais membranas continham picos discretos em 20° , que correspondiam à difração do plano (110) da celulose II.

De acordo com Gea *et al.* (2011), concentração de NaOH superior a 6% pode mudar a estrutura cristalina da celulose I para II. Nesse trabalho, nenhuma das concentrações de NaOH empregadas ultrapassou esse percentual (a concentração máxima foi de 4%), porém os tratamentos foram associados ao aquecimento em micro-ondas, que acelerou e/ou intensificou a interação do álcali com a celulose, provocando mudança estrutural, justificando assim a conversão de celulose I em II a concentrações de NaOH inferiores a 6%.

A característica de material mais uniforme, sem definição aparente das fitas como se observa nas imagens das membranas 1 e 7 (Figura 26 e 27) e nos difratogramas, pode ser decorrente do índice de cristalinidade e percentual cristalino, que são os menores valores dentre os de todas as amostras (Tabela 3).

Considerando-se que o cálculo do diâmetro médio dos cristalitos (d) é baseado em medidas realizadas manualmente e que, portanto, a exatidão dos valores obtidos não é elevada, apenas as diferenças maiores ou iguais a 10% foram consideradas significativas. As diferenças das demais medidas foram consideradas significativas a partir de 5%.

Não houve mudanças significativas na distância entre os mesmos planos cristalinos das membranas submetidas aos diferentes tratamentos.

Tabela 3. Índice de cristalinidade e percentual cristalino das membranas submetidas aos diferentes tratamentos de purificação com NaOH.

Membranas:		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
[NaOH]		0,85	0,15	0,85	0,15	1,00	0,00	0,50	0	0,50	
T (min)		12,70	12,70	3,30	3,30	7,00	7,00	15,00	0	7,00	
Planos	Parâmetros										
Celulose I	(1 $\bar{1}$ 0)	Ângulo	-	14,42	14,30	14,53	14,53	14,37	-	14,50	14,63
		Intensidade	-	285,59	484,33	365,85	651,91	501,09	-	858,80	707,47
		d _{hkl}	-	0,344	0,346	0,341	0,341	0,344	-	0,341	0,338
		d	-	18,19	18,43	16,65	17,81	15,53	-	12,89	20,68
	(110)	Ângulo	-	14,42	16,71	16,86	16,71	16,71	-	16,50	16,78
		Intensidade	-	285,59	185,61	164,57	275,95	280,33	-	353,63	268,67
		d _{hkl}	-	0,290	0,300	0,294	0,300	0,298	-	0,301	0,297
		d	-	21,22	14,78	14,22	14,53	14,78	-	10,54	15,50
	(200)	Ângulo	-	22,54	22,62	22,46	22,84	22,46	-	22,60	22,74
		Intensidade	-	354,08	634,43	516,21	957,92	874,86	-	1138,60	869,76
		d _{hkl}	-	0,222	0,222	0,223	0,220	0,223	-	0,222	0,220
		d	-	20,33	20,35	18,24	20,07	17,07	-	13,45	21,67
Celulose II	(1 $\bar{1}$ 0)	Ângulo	11,66	-	-	-	-	-	11,79	-	-
		Intensidade	73,73	-	-	-	-	-	94,4	-	-
		d _{hkl}	0,420	-	-	-	-	-	0,419	-	-
		d	6,08	-	-	-	-	-	7,04	-	-
	(110)	Ângulo	19,90	20,08	20,26	-	-	19,90	19,96	20,08	20,00
		Intensidade	178,32	113,51	178,78	-	-	265,03	207,05	113,51	203,09
		d _{hkl}	0,251	0,250	0,250	-	-	0,251	0,250	0,250	0,250
		d	9,41	12,05	11,53	-	-	13,75	9,91	12,05	12,27
	(200)	Ângulo	21,54	-	-	-	-	-	21,79	-	-
		Intensidade	156,28	-	-	-	-	-	200,82	-	-
		d _{hkl}	0,232	-	-	-	-	-	0,230	-	-
		d	10,43	-	-	-	-	-	12,69	-	-
IC		0,79	0,84	0,88	0,83	0,88	0,82	0,75	0,82	0,89	
%Cr		82,55	86,41	89,40	85,46	89,30	84,61	79,69	84,46	90,40	

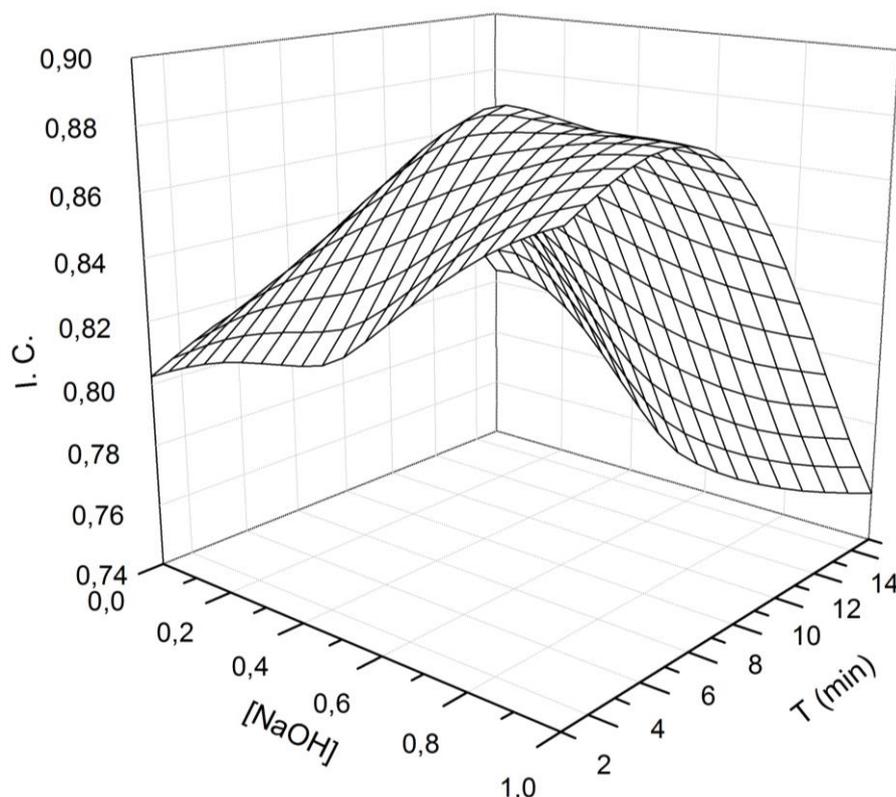
O diâmetro dos cristalitos pode ser relacionado ao polimorfo e ao tratamento a que a estrutura cristalina original foi submetida, tal como se apresenta a seguir:

- 1) os diâmetros médios dos cristalitos de todos os planos de difração da celulose II foram inferiores aos da celulose I, característica mais acentuada para o plano $(1\ \bar{1}\ 0)$;
- 2) o diâmetro médio dos cristalitos do plano (110) da membrana 2 foi maior que o de todas as outras membranas e este tratamento foi o mais severo, depois dos tratamentos 1 e 7, cuja celulose I foi totalmente convertida em celulose II;
- 3) os diâmetros médios dos cristalitos do plano (110) da celulose II nas membranas 1 e 7 foram menores que os das demais membranas.

Considerando que os diâmetros médios dos cristalitos na celulose padrão, sem tratamento (BC), são menores que todos, nos três planos, é possível afirmar que essas observações são um indicativo de que o diâmetro médio dos cristalitos está relacionado ao tratamento a que a estrutura cristalina foi submetida. No que se refere à celulose I, os tratamentos mais severos provocaram aumento do diâmetro médio dos cristalitos. Por outro lado, quando se tratava de celulose II, polimorfo cuja formação foi provocada pelo tratamento, os diâmetros dos cristalitos foram menores nas amostras submetidas aos tratamentos mais severos. Isto pôde ser observado possivelmente por causa da desorganização obtida na desconstrução da celulose I e reorganização na consolidação da nova estrutura cristalina da celulose II. As amostras submetidas aos tratamentos mais severos possivelmente apresentaram diâmetros médios menores por causa da maior velocidade de conversão de celulose I em II, que resultou na mais rápida reorganização molecular, originando cristalitos mais compactos na celulose II.

A Figura 32 contém a representação gráfica da variação do índice de cristalinidade com a variação da concentração da solução de NaOH (mol.L^{-1}) e do tempo de aquecimento em micro-ondas.

Figura 31. Influência da concentração de NaOH e do tempo de aquecimento ao micro-ondas sobre o índice de cristalinidade da celulose bacteriana



Fonte: Dados da pesquisa

O gráfico de superfície da Figura 32 permite a verificação de que o tempo de 8 min de aquecimento é importante, pois foi a partir desse que os efeitos sobre o I.C. foram mais intensos.

O IC sofreu variação acentuada com o aumento do tempo de aquecimento, de tal forma que, em tempos menores que 8 min, houve aumento do IC, quando a concentração de NaOH também aumentou. Prosseguir com aquecimento do meio por mais de 8 min significou redução do IC com aumento da concentração de NaOH. Ao fixar o tempo de aquecimento em 8 min foi possível notar que, a partir de $[\text{NaOH}] 0,4 \text{ mol.L}^{-1}$, o IC não sofreu alterações significativas.

Com base nesses resultados, é possível afirmar que ambos os fatores estudados influenciam a remoção das impurezas da celulose bacteriana, porém o tempo de aquecimento influencia em maior grau a conversão de celulose I

em II, ou seja, a reestruturação molecular, enquanto que a concentração de NaOH influencia principalmente na remoção das impurezas e dos restos celulares. Tal remoção, por sua vez, eleva a capacidade de retenção de água da membrana de celulose, provavelmente pela retirada de compostos e estruturas celulares que comprometem a disponibilidade das hidroxilas do polissacarídeo, que ficam susceptíveis à interação com moléculas de água.

A associação de concentração de NaOH a $0,85 \text{ mol.L}^{-1}$, com aquecimento por 3,3 min, foi suficiente para a remoção efetiva das impurezas das membranas sem que a estrutura cristalina seja comprometida. No entanto, o aumento do tempo de aquecimento promoveu a conversão de celulose I em II a partir de 7 min de aquecimento, completando aos 12,5 min, com a mesma concentração de álcali. O diâmetro médio dos cristalitos da fase cristalina da celulose também foi alterado como reflexo da severidade do tratamento a que foi submetida.

A influência da concentração de NaOH e do tempo de aquecimento sobre o índice de cristalinidade da membrana atuou de maneira inversa àquela exercida sobre a espessura das fitas de celulose. Esta inversão mostrou-se mais evidente quando se observou a variação de ambos os fatores dependentes com o aumento do tempo de aquecimento em micro-ondas nas maiores concentrações de NaOH, provocando redução do índice de cristalinidade da celulose e aumento da espessura das fitas de forma igualmente acentuada. Isso indica a inter-relação destes dois efeitos e também que tais condições provocam o afastamento das cadeias de celulose com consequente desorganização da estrutura cristalina e aumento da espessura das fitas.

5.3 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES COMESTÍVEIS DE CELULOSE ASSOCIADA A MANITOL E GLICEROL

Identificadas as condições ideais de produção da celulose pela *G. xylinus*; a possibilidade de essa síntese ser processada a partir de resíduos industriais, assim como os fatores a serem controlados para maior purificação da membrana de celulose, mantendo alta capacidade de retenção de água e

estrutura fibrilar mais organizada, investigou-se uma aplicação farmacêutica da membrana voltada para a área de alimentos, qual seja, a produção de filmes comestíveis de celulose bacteriana empregando manitol e glicerol.

Características gerais dos filmes

O manitol foi inicialmente testado como único aditivo adicionado à membrana de celulose bacteriana, em concentrações variando de 9,23 g.L⁻¹ a 200,13 g.L⁻¹, selecionadas com base na solubilidade do poliálcool em água. Ao constatar que os filmes assim obtidos apresentavam-se excessivamente cristalizados, secos e friáveis, o que inviabilizava muitas de suas potenciais aplicações na área de abrangência da Farmácia como área de conhecimento, o planejamento foi descontinuado.

Um novo planejamento foi elaborado reduzindo a concentração do manitol e incluindo o glicerol à composição dos filmes, por sua ação plastificante. Para atender ao objetivo de produção de filmes a serem empregados na área de alimentos, era fundamental não comprometer a flexibilidade e a resistência dos filmes à manipulação. Assim, testaram-se diversas combinações de concentrações de ambos os aditivos até que se identificou que concentração máxima de manitol e mínima de glicerol conferiam a todos os filmes produzidos com celulose, após secagem, manutenção da integridade e características ideais à utilização do objeto do estudo.

Os filmes, cuja composição incluiu mais de 6% de manitol na mistura de aditivos, apresentaram visível cristalização, porém sem comprometimento significativo da resistência ao manuseio nem à flexibilidade. Os filmes E3 e E5, preparados com maiores concentrações de manitol, mostraram-se mais secos. No entanto, os produzidos com baixas concentrações de manitol combinadas com maiores concentrações de glicerol (E2, E6 e E7) mostraram-se visivelmente mais maleáveis. O filme E4, que continha concentrações intermediárias de manitol e glicerol não se apresentou seco, porém não mantinha flexibilidade semelhante à observada nos filmes E2, E6 e E7. De maneira geral, não houve alteração significativa de cor ou odor dos filmes em relação à membrana pura.

Todos os filmes produzidos foram caracterizados, porém as análises morfológicas e estruturais foram realizadas apenas nos filmes E5 a E9, que foram produzidos com as concentrações extremas e as intermediárias de glicerol e manitol e mostraram-se suficientes para responder às questões deste trabalho.

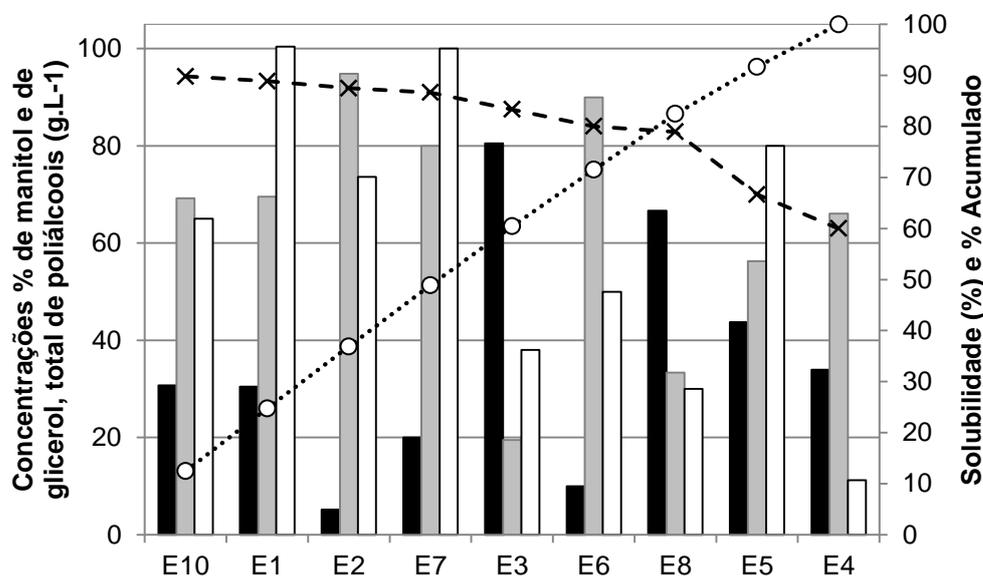
Solubilidade

Celulose é um polímero insolúvel em água (solubilidade = 0%) e todos os filmes produzidos apresentaram solubilidade maior que a da membrana pura, o que pode ser justificado em parte pelo conteúdo de aditivos solúveis utilizado. A molécula do glicerol é pequena, com três carbonos, e contém três hidroxilas sendo isso responsável pela sua solubilidade em água e sua higroscopicidade. O manitol é uma molécula com cadeia alifática de seis membros e seis hidroxilas que também lhe conferem solubilidade em água, mas não é higroscópico como o glicerol (BEATRIZ *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Na Figura 33 estão representadas a solubilidade dos filmes e as quantidades totais e individuais (%) dos poliálcoois utilizados na produção de cada filme.

Os efeitos principais das concentrações de manitol e de glicerol não se mostraram significativos, mas o efeito de interação entre os fatores sim. A variação da solubilidade dos filmes também não esteve relacionada com a concentração total de poliálcoois, com a de glicerol ou a de manitol. A proporção entre os poliálcoois, porém, resultou em mudanças significativas na solubilidade, possibilitando agrupar os filmes pela solubilidade resultante, mesmo que a composição dos mesmos apresentasse diferenças significativas entre os valores absolutos de poliálcoois totais, de glicerol e de manitol. Os filmes E10 e E1 foram os mais solúveis e apresentam proporção glicerol / manitol de 2,2 e solubilidade de 89%, considerada a melhor proporção de poliálcoois a ser utilizada para a elevação da solubilidade dos filmes dentre as testadas, mesmo tendo total de poliálcoois consideravelmente diferentes (65 g.L⁻¹ e 100,4 g.L⁻¹, respectivamente).

Figura 32. Variação e diagrama de Pareto da solubilidade dos filmes produzidos % (m/m) com as concentrações totais de poliálcoois e as proporções relativas de manitol e glicerol utilizadas (%)



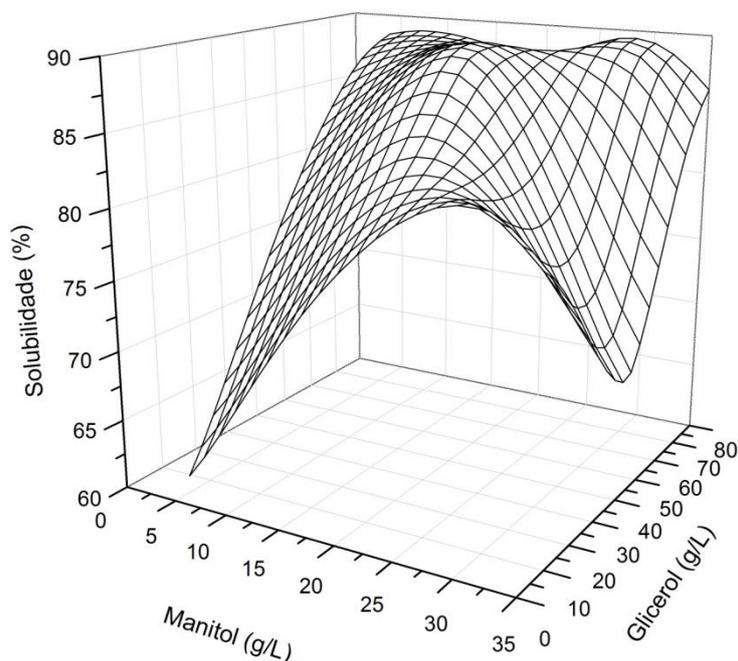
Fonte: Dados da pesquisa

Legendas: E10 - média dos resultados dos filmes E9-E11; (■) manitol (%), (■) glicerol (%), (□) poliálcoois totais (g.L⁻¹), (---X---) solubilidade (%), e (...○...) % Acumulado

O manitol é solúvel em cinco partes de água e em 18 de glicerol (OLIVEIRA *et al.*, 2009; STULZER & TAGLIARI, 2006). Assim, o glicerol influenciou a solubilidade do manitol e ambos influenciaram a solubilidade total do filme pelo número de hidroxilas livres e formação de ligações de hidrogênio com a água. O filme E4 tinha um percentual de glicerol semelhante ao dos filmes E10 e E1, porém a solubilidade foi consideravelmente menor, devido à menor quantidade total de poliálcoois.

A solubilidade sofreu efeito de interação entre os fatores, de forma que a influência de cada um sobre essa característica dependeu da concentração do outro. Ao construir o gráfico de superfície a partir dos dados obtidos com esse planejamento (Figura 34), foi possível estimar a maior solubilidade que pode ser atingida pelos filmes de celulose com glicerol e manitol, superando 95%, valor obtido com concentrações não máximas ou mínimas, de ambos os polióis dentre as testadas.

Figura 33. Influência das concentrações de manitol e de glicerol sobre a solubilidade do filme



As solubilidades dos filmes variaram entre 60% e 89,8%. Tal variação foi inferior à obtida por Almeida *et al.* (2013), cujos filmes eram compostos por celulose associada a fécula de batata e glicerol e as solubilidades variaram entre 27% e 80%. Os filmes com solubilidade mais elevada são preferíveis para aplicações farmacêuticas por via oral (para aplicação em alimentos ou veiculando medicamentos) por serem mais facilmente digeríveis, por liberarem mais rapidamente os componentes que podem estar carreando e também pelo aspecto sensorial referente ao tato, pois se dissolvem mais facilmente quando em contato com a saliva (ALMEIDA *et al.*, 2013; COLARES-QUEIROS, 2007).

O único componente insolúvel dos filmes correspondeu à celulose, sendo essa insolubilidade também importante por agregar maior quantidade de fibras insolúveis ao alimento, melhorando a motilidade intestinal (MAFFEI, 2004). Considerando-se que a celulose representa apenas 0,1 % da massa de membrana, que as porções insolúveis dos filmes produzidos correspondem a um percentual maior que esse na composição geral do filme e que a água livre foi completamente removida durante a secagem, os poliálcoois provavelmente interagiram fortemente com a celulose, de forma a impossibilitar sua remoção

por difusão em meio aquoso, o que justifica a solubilidade inferior a 95% de parte dos filmes.

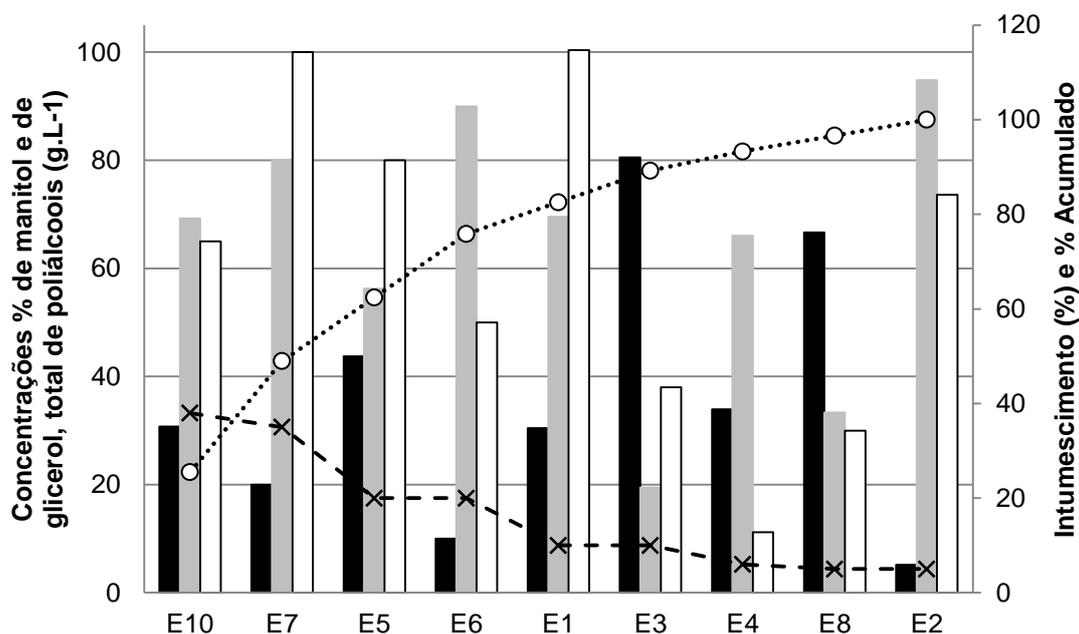
Intumescimento

Todos os filmes apresentaram intumescimento maior que 0,001%, correspondente à membrana pura, conforme exposto na Figura 35, contudo essa diferença não foi significativa. O filme que apresentou maior intumescimento foi o E10, para o qual também foi verificada maior solubilidade, dentre os filmes produzidos, entretanto como a taxa de intumescimento é determinada em comparação com a massa de celulose e essa é muito pequena, a quantidade de água retida no intumescimento dos filmes pode não comprometer a integridade do alimento por ele recoberto.

Considerando que o intumescimento consiste no aumento do volume do filme pela entrada de água na trama celulósica e retenção pelo mesmo. Ao identificar que os filmes produzidos tinham uma taxa de intumescimento semelhante à da membrana celulósica, pode-se afirmar que tais têm a possibilidade de contribuir para a preservação de alimentos que sejam por eles envoltos. Por outro lado, as taxas de intumescimento dos filmes produzidos, em sendo pouco maiores que a da membrana de celulose pura, podem favorecer maior solubilização, exercendo efeito positivo sobre a percepção tátil do alimento para o indivíduo, o que também favorece sua aceitação.

O intumescimento dos filmes não apresentou relação linear com as concentrações de manitol, de glicerol nem com o somatório das concentrações de ambos os poliálcoois, o que caracteriza efeito de interação entre os fatores.

Figura 34. Representação gráfica da variação das concentrações totais de poliálcoois, das proporções relativas de manitol e glicerol utilizadas e taxa de intumescimento e gráfico de Pareto



Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: (■) manitol (%), (■) glicerol (%), (□) poliálcoois totais (g.L⁻¹), (---x---) intumescimento e (...o...) % acumulado.

Os filmes E2 e E6 contêm concentrações percentuais de manitol e glicerol próximas, mas um total (em g.L⁻¹) distinto, que ao ser aumentado, proporcionou redução no intumescimento. Por outro lado, quando se comparam E4 e E1, cujas concentrações percentuais dos poliálcoois são semelhantes, é possível verificar que a maior concentração total de poliálcoois em E1 causou elevação do intumescimento. E1 e E7 possuem a mesma concentração (em g.L⁻¹), e diferentes concentrações percentuais dos poliálcoois. Nessas condições, o aumento no percentual de glicerol e redução do manitol aumentou o índice de intumescimento.

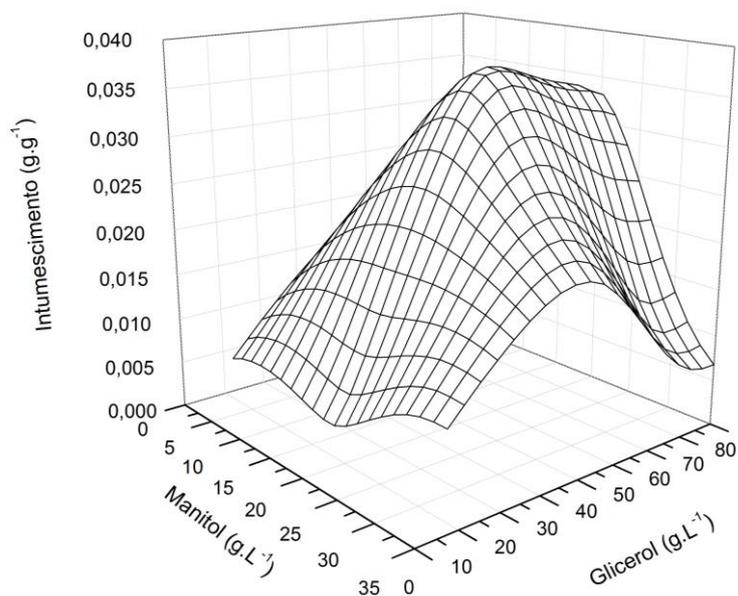
A celulose bacteriana é um polímero com alta cristalinidade e resistência à tensão, além de elevada capacidade de absorção e retenção de água (BARUD, 2006). A celulose sozinha intumescer em água e, quando o glicerol é adicionado a ela, esse intumescimento aumenta (ALMEIDA *et al.*, 2013).

O manitol e o glicerol aumentam o espaço intermolecular na celulose e a ampliação desses espaços resulta em maior superfície de sorção de água (CHENG *et al.*, 2006). Por outro lado, os polióis têm uma afinidade elevada por

moléculas de água, devido à disponibilidade de hidroxilas livres em sua composição química, do que deriva afirmar que tal absorção se constitui de água ligada. Daí decorre que, apesar de os filmes celulósicos intumescerem e aumentarem sua solubilização, não disponibilizam água livre para utilização no metabolismo bacteriano, mantendo assim o poder de preservação de alimentos.

O gráfico de superfície, dos resultados de intumescimento resultante dos dados do planejamento fatorial, indica que o maior valor de intumescimento do filme foi obtido utilizando-se 16 g.L⁻¹ de manitol e 55 g.L⁻¹ de glicerol (Figura 36).

Figura 35. Gráfico de superfície para o efeito de manitol e de glicerol sobre o intumescimento dos filmes produzidos



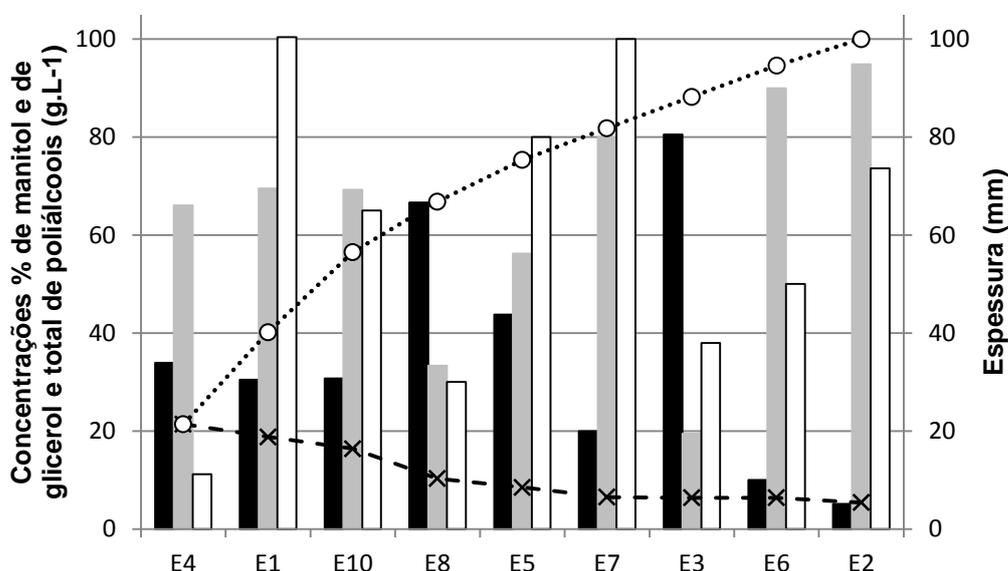
Fonte: Dados da pesquisa

Concentrações maiores ou menores de glicerol e de manitol reduzem a taxa de intumescimento do filme e o efeito do glicerol parece ser mais intenso do que o do manitol sobre essa característica, tendo em vista a elevação mais acentuada do intumescimento do filme com o aumento da concentração de glicerol (até o valor máximo) do que com o manitol.

Espessura

A espessura do filme foi influenciada pelos efeitos principais de ambos os poliálcoois adicionados, bem como pela interação entre eles. A espessura média da celulose padrão, sem tratamento, denominada de mBC, foi 0,010 mm e, nos 11 tratamentos, variou de 0,005 a 0,021 mm. Pode-se verificar na Figura 37 que os filmes com menores espessuras continham concentrações maiores ou iguais a 80% (p/p) de um dos poliálcoois.

Figura 36. Representação gráfica da variação da espessura dos filmes com as concentrações totais de poliálcoois e proporções relativas de manitol e glicerol utilizadas em diagrama de Pareto



Fonte: Dados de Autora

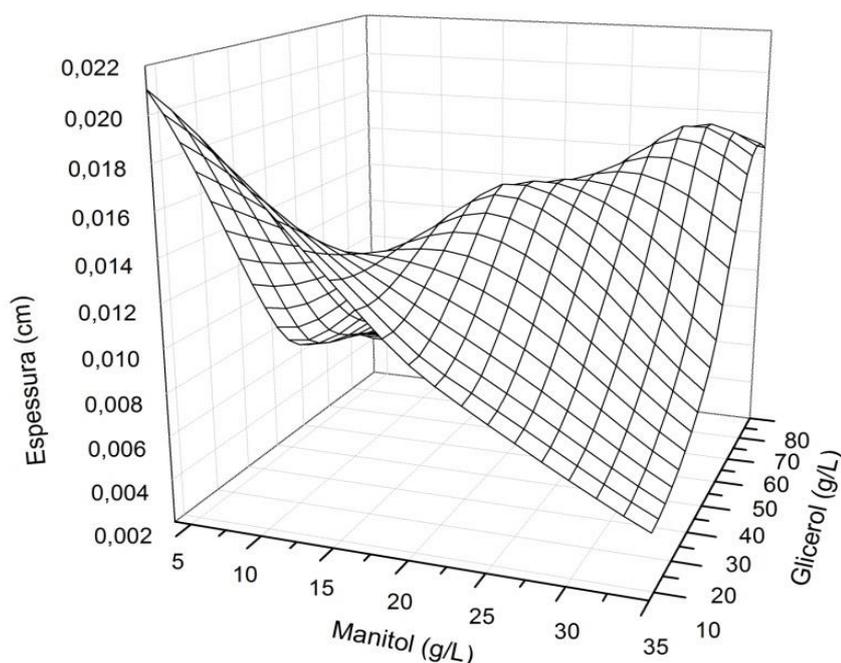
Legenda: (■) manitol (%), (■) glicerol (%), (□) poliálcoois totais (g.L⁻¹), (---x---) espessura (mm) x 1000, e (...o...) % Acumulado

O aumento das concentrações de poliálcoois resultou em redução da espessura, confirmando o efeito de interação entre os fatores sobre a espessura do filme formado. Os filmes E2 até E7 continham 70% a 95% de um dos poliálcoois e espessura menor que a dos demais filmes.

Da observação da Figura 38, de maneira geral, depreende-se que o predomínio de um dos poliálcoois na composição química do filme acarretou redução da espessura. No entanto pode-se afirmar que misturas mais

homogêneas de poliálcoois elevaram a espessura da membrana. Resultados análogos foram obtidos por outros autores (MATTA Jr. *et al.*, 2011; LAMIM, 2006), ao identificarem que a associação de glicerol a polímeros eleva a espessura da celulose.

Figura 37. Gráfico de superfície 3D do efeito das concentrações de glicerol e manitol sobre a espessura dos filmes formados



Fonte: Dados da pesquisa

O estudo realizado por Almeida *et al.* (2013) corrobora com os achados deste trabalho e acrescenta que a elevação da concentração de glicerol em 5 % entre os filmes que o contêm reduz sua espessura, o que se justifica pelo fato de o glicerol diminuir a rigidez da celulose possibilitando maior mobilidade entre as cadeias poliméricas, além de reduzir a proporção de matéria seca pela retenção de água.

Essa constatação reforça a discussão encetada anteriormente sobre a composição química de poliálcoolis, o intumescimento e a retenção de água, com ênfase na aplicação dos filmes comestíveis. Dessa forma, identificou-se que as concentrações relativas de poliálcoolis podem ser utilizadas como ferramentas para adequação das características de intumescimento, espessura

do filme e retenção de água, a serem modificadas segundo a utilização pretendida para o filme celulósico.

Transparência

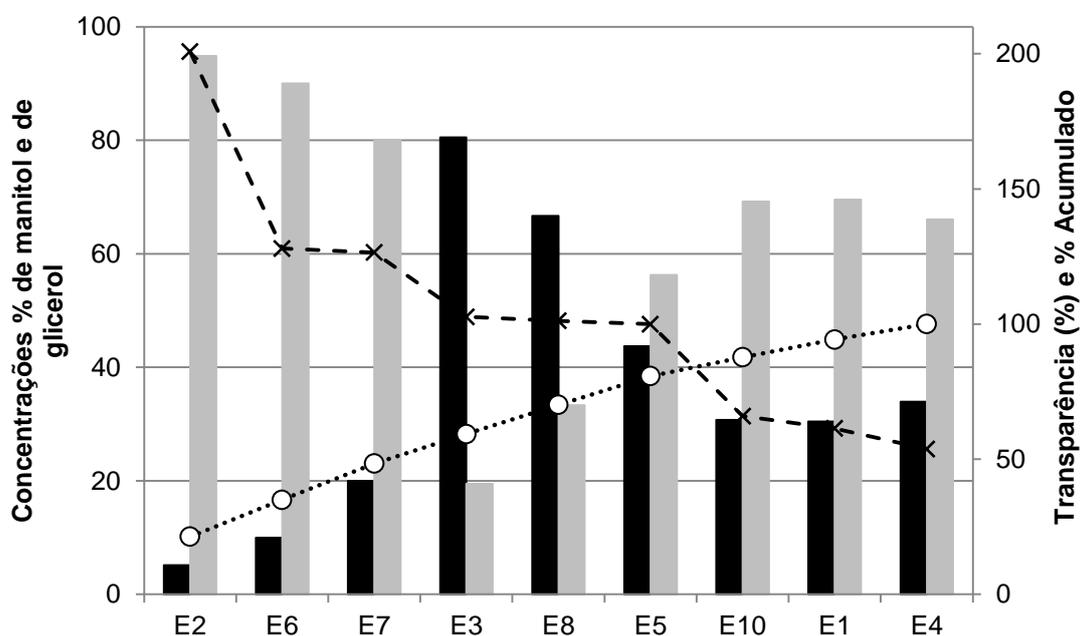
A medida simples da transmitância é muito útil para se avaliar a transparência dos filmes. De acordo com Liang *et al.* (2007), a transmitância é um indicativo da miscibilidade entre os componentes de um filme. A elevada transparência de todos os filmes produzidos é um forte indicativo de que os poliálcoois e a celulose apresentaram-se bem misturados e interagindo bem quimicamente. Ambos os poliálcoois elevaram a transparência provavelmente por se misturarem, intercalando-se entre as cadeias de celulose, afastando-as e reduzindo, conseqüentemente, o grau de cristalinidade das mesmas e, portanto, o grau de reflexão da luz incidente.

Em filmes em que o manitol foi utilizado em concentrações maiores que 20%, como no filme E3, sua cristalização pôde ser vista a olho desarmado apesar de a flexibilidade e resistência à manipulação não terem sido aparentemente afetadas. Estes cristais de manitol provavelmente foram os responsáveis pela maior opacidade dos filmes. Apesar disso, o filme E3, em que 80% do total de aditivos era de manitol, apresentou elevada transparência (Figura 39).

Os filmes E10, E4, e E1 apresentaram-se mais opacos que a mBC, compostos por glicerol (66-69%) e manitol (30-33%). Isto se deu pelas concentrações de manitol superarem 20% e os filmes apresentarem espessura elevada.

Os filmes E7, E6 e E2 foram os que apresentaram transparência mais elevada, constituídos pelas mais altas concentrações de glicerol, que se intercala com muita afinidade entre as cadeias de celulose e retém moléculas de água, e as menores concentrações de manitol, possibilitando total solubilização deste no glicerol e na água retida por este último no filme. Estes fatores reduziram a cristalização do manitol e também as regiões cristalinas de celulose, o que justificou a maior transparência do filme.

Figura 38. Representação gráfica da variação das proporções relativas de manitol e glicerol utilizadas e da transparência do filme em diagrama de Pareto

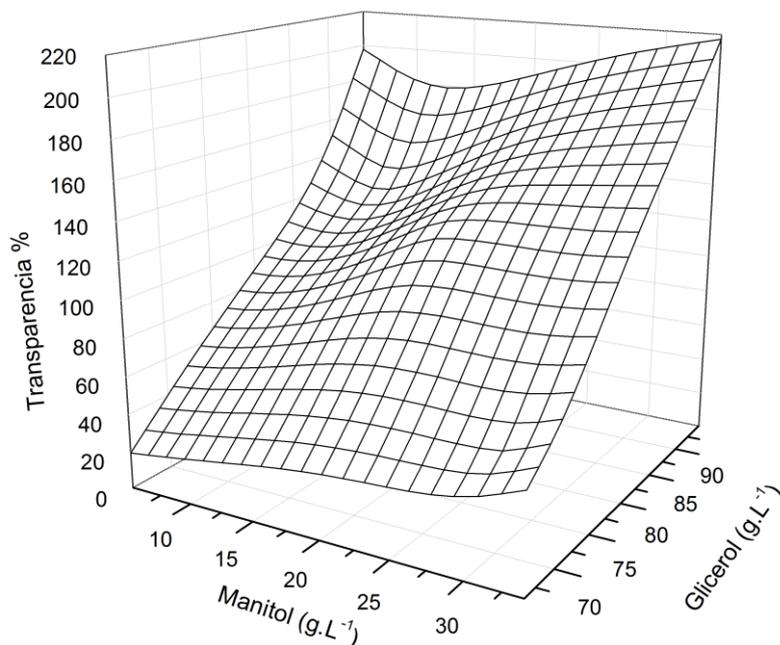


Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: (■) manitol (%), (■) glicerol (%), (---X---) transparência (%), e (...○...) % acumulado.

Adicionalmente, constatou-se que o efeito do glicerol sobre a transparência do filme foi mais significativo do que o do manitol, ao analisar os valores de transparência dos filmes produzidos e as proporções de manitol e de glicerol utilizados na sua produção apresentados na Figura 40.

Figura 39. Gráfico de superfície do efeito das concentrações (%) de glicerol e manitol sobre a transparência dos filmes formados



Fonte: Dados da pesquisa

Diferente do glicerol, o manitol não é higroscópico (OLIVEIRA *et al.*, 2009) e, portanto, não interage tão bem com a água, porém é mais solúvel em glicerol do que em água e, na presença de maiores concentrações do mesmo se comportou de maneira diferente. Quando juntos, resultaram na produção de filmes mais transparentes, pelo aumento da interação com a água e permanente dissolução do manitol em glicerol (STULZER & TAGLIARI, 2006), diminuindo assim a cristalização durante a secagem do filme.

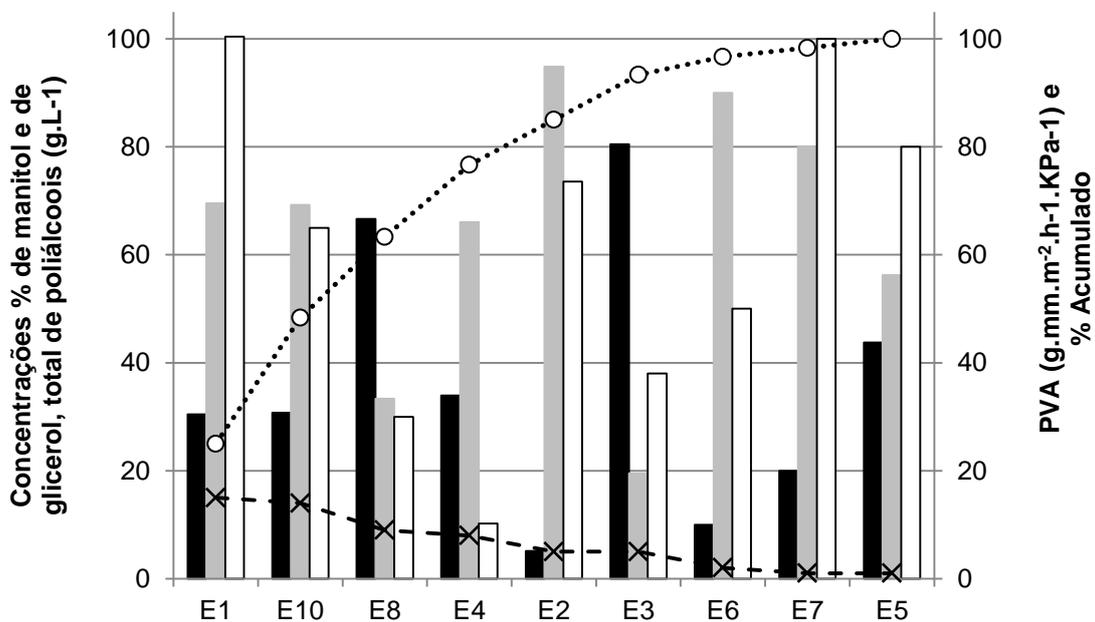
Permeabilidade

Na Figura 41 tem-se a permeabilidade dos filmes produzidos relacionada com as concentrações de manitol e glicerol. Todos os filmes produzidos apresentaram permeabilidades ao vapor de água (PVA) menores que os 0,24 g.mm.m⁻².h⁻¹.kPa⁻¹ da membrana pura, provavelmente pelo fato de os aditivos reduzirem o número e o tamanho dos poros da membrana, aumentarem a espessura e também da interação com a água, o que dificultou a travessia do vapor. Para que a água atravessasse o filme, ela precisa evaporar a partir do

mesmo (dessorver) após ter interagido com seus componentes (adsorver). A adição dos poliálcoois possivelmente elevou a afinidade da água pelo filme, o que dificultou a liberação do vapor a partir do mesmo para o ambiente externo.

A permeabilidade não se apresentou linear em relação às concentrações percentuais de manitol e/ou de glicerol, nem com relação à concentração total dos poliálcoois, expressa em g.L^{-1} , o que confirma o efeito de interação entre os fatores testados.

Figura 40. Variação da permeabilidade ao vapor de água dos filmes com as concentrações totais de poliálcoois e proporções relativas de manitol e glicerol em diagrama de Pareto



Fonte: Dados da pesquisa

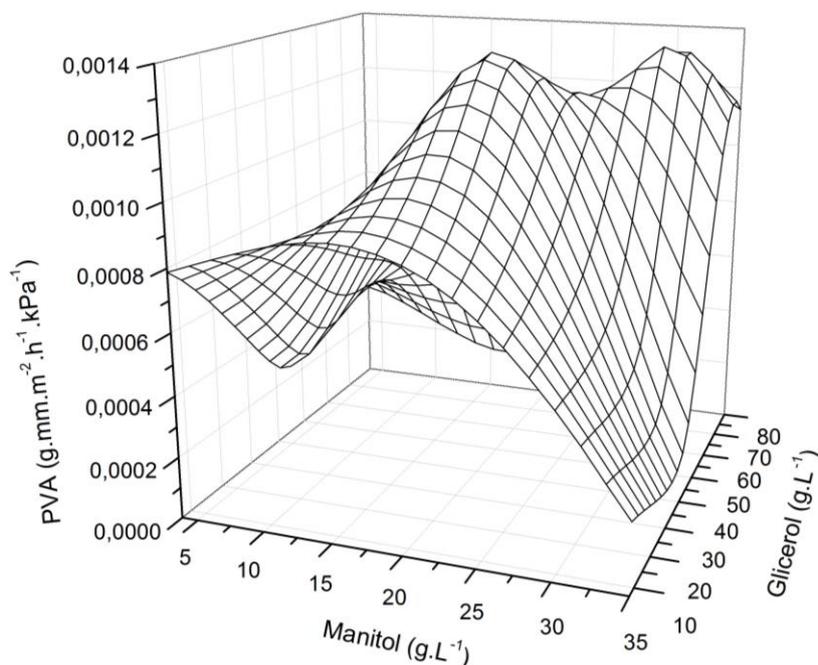
Legenda: PVA - permeabilidade ao vapor de água; (■) manitol (%), (■) glicerol (%), (□) poliálcoois totais (g.L^{-1}), (---x---) permeabilidade ao vapor de água ($\text{g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$) e (...o...) % Acumulado.

No gráfico de superfície construído para esse planejamento fatorial, a maior permeabilidade ao vapor de água de filmes produzidos com celulose, manitol e glicerol ($0,0013 \text{ g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$) nas faixas de concentrações testadas, foi a que continham 18 g.L^{-1} de manitol e 50 g.L^{-1} de glicerol (Figura 42).

Concentrações maiores ou menores de qualquer um dos poliálcoois reduz a permeabilidade do filme. A influência da concentração do manitol foi mais acentuada do que a do glicerol, provavelmente pelo fato de o manitol não apresentar elevada afinidade pela água e também ocupar o glicerol dos filmes para sua solvatação, reduzindo a quantidade de moléculas livres para reter o vapor de água.

Por outro lado, reduzidos valores de permeabilidade também podem ser obtidos quando são usadas concentrações baixas de glicerol e elevadas de manitol. Nestes casos, todo o glicerol encontra-se ocupado, interagindo com celulose e/ou manitol. Um grande excesso de manitol permanece não solvatado. O manitol excedente, não solubilizado, não é higroscópico e não interage bem com vapor de água, mesmo em ambientes com umidade relativa superior a 90% (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Por isso a adsorção da água em forma de vapor no filme é prejudicada justificando a reduzida permeabilidade.

Figura 41. Gráfico de superfície que representa os efeitos das concentrações de manitol e de glicerol sobre a PVA dos filmes produzidos com celulose



Fonte: Dados da pesquisa

Diferentes autores relataram o aumento da permeabilidade ao vapor de água de seus filmes com o aumento da concentração de glicerol, por ser higroscópico e por causar maior espaçamento da cadeia polimérica (LAMIM, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2013; MATTA Jr. *et al.*, 2011; ROCHA *et al.*, 2014, BARBOSA *et al.*, 2011). Todavia os mesmos utilizaram exclusivamente glicerol ou adicionaram uma mistura de substâncias hidrofílicas. Rocha *et al.* (2014) encontraram valores entre $0,393 \text{ g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$ e $0,570 \text{ g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$ para filmes de amido e de extrato protéico de soja, enquanto Ortiz (2009) encontrou valores entre $1,52 \text{ g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$ e $2,53 \text{ g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$ para filmes de farinha de mandioca e proteína de soja.

Neste trabalho, mesmo com o aumento do glicerol a permeabilidade ao vapor de água foi diminuída com relação à membrana pura, mostrando que as características do manitol influenciaram consideravelmente a interação dos filmes com o vapor de água. A permeabilidade ao vapor de água dos filmes produzidos neste estudo teve valor máximo igual a $0,002 \text{ g.mm.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{kPa}^{-1}$, o que os tornou úteis a aplicações em que se deseja proteger o conteúdo (alimento, medicamento ou outra substância) da umidade do ambiente durante um período de armazenamento. Filmes com essa característica, quando usados como revestimento, diminuem a degradação do conteúdo e a perda de massa pela evaporação da água (RODRIGUES, 2012).

Análise morfológica dos filmes por microscopia eletrônica de varredura

Uma avaliação mais acurada dos filmes produzidos requer análise de imagens para verificar os efeitos das diferentes concentrações de manitol e de glicerol sobre a morfologia das fibras de celulose, do que decorreu empregar microscopia eletrônica de varredura (Figura 43).

As imagens de microscopia eletrônica revelaram que os filmes E5 a E9 apresentaram superfície mais lisa e densa do que a da membrana pura, com fitas menos aparentes ou não visíveis, por causa do seu conteúdo de poliálcoois e da considerável plastificação da celulose pelos mesmos, confirmando e justificando os resultados observados pela medida dos demais parâmetros.

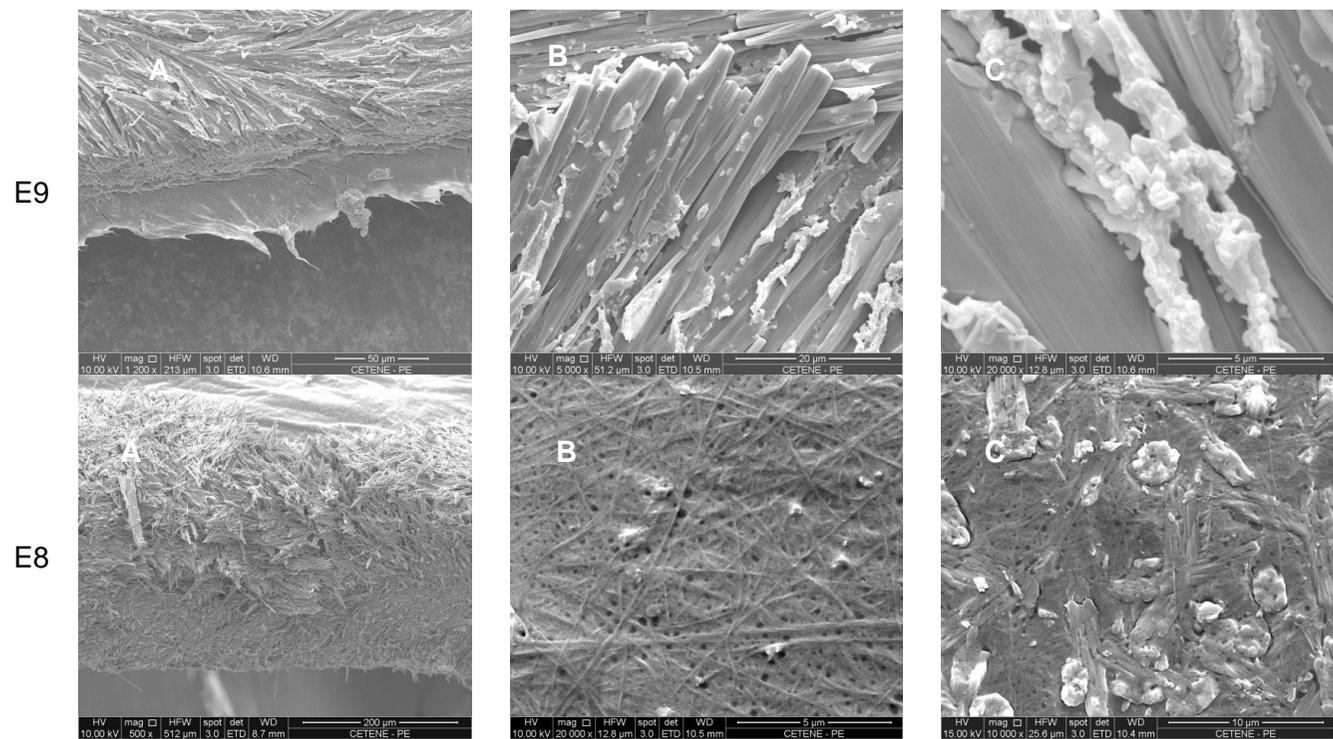
A transparência do filme E5, por exemplo, pode ser percebida pela sombra dos cristais localizados atrás do filme. Em todos os filmes foram visualizados cristais de manitol mais concentrados nas laterais em que foram realizados os cortes do que em suas superfícies (Figura 43, coluna A). Os cristais encontraram-se organizados paralelamente às fibras da celulose e não transversalmente, o que remete ao provável direcionamento do crescimento dos mesmos pelas fibras da celulose, no mesmo sentido. A desorganização estrutural da celulose provocada por concentrações maiores de glicerol resultou na formação de cristais de manitol em sentidos aleatórios (Figura 43 E7A) e pôde ser comprovada pelo menor índice de cristalinidade da celulose.

Os filmes E6, E9 e E5 foram produzidos com a mesma concentração de glicerol (45 g.L^{-1}), mas concentrações decrescentes de manitol (35 g.L^{-1} , 5 g.L^{-1} e 20 g.L^{-1} , respectivamente). Na superfície dos filmes E5 ainda é possível a visualização das fitas de celulose (E5c), o que não acontece nas dos filmes E6 e E9.

Os filmes E7, E8 e E9, por sua vez, foram produzidos com as mesmas concentrações de manitol (20 g.L^{-1}) e diferentes de glicerol (80 g.L^{-1} , 10 g.L^{-1} e 45 g.L^{-1} , respectivamente). O filme E7, produzido com a maior concentração de glicerol testada (80 g.L^{-1}), assemelhou-se a uma massa uniforme (E7b), que fundia e rachava mais facilmente do que os demais quando submetido a um feixe de elétrons menos disperso. O afastamento das partes ocorria por deslizamento, com aparência de fluido viscoso uniforme. Também foi possível visualizar neste filme, diferente dos outros, cristais de manitol parcialmente solvatados, provavelmente pelo excesso de glicerol (E7c), o que não foi percebido nos demais.

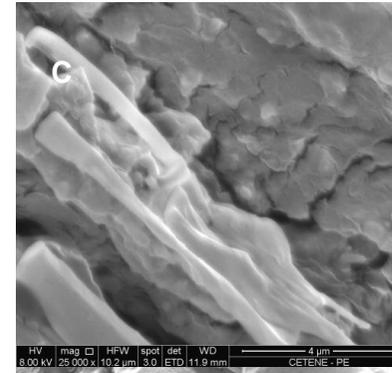
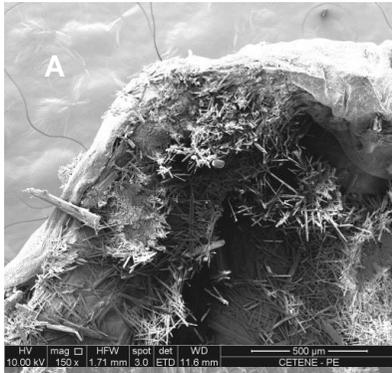
Foi possível visualizar também nitidamente os poros do filme E8, cuja proporção manitol: glicerol foi a maior dentre os filmes observados.

Figura 42. Imagens de microscopia eletrônica dos filmes E5 a E9

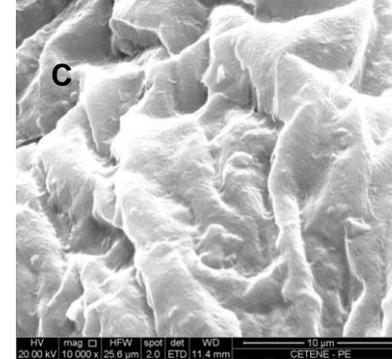
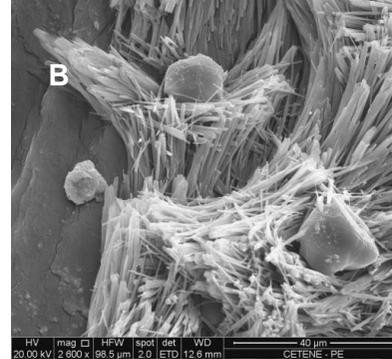
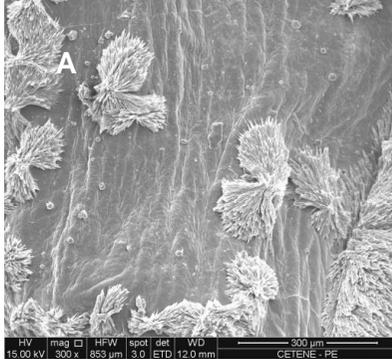


continua

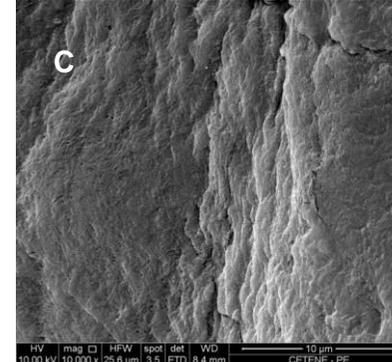
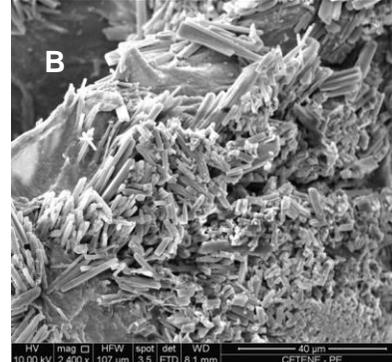
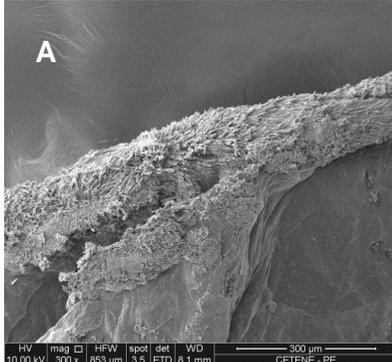
E7



E6



E5



Legendas: filme E5 - 35 g.L⁻¹ de manitol e 45 g.L⁻¹ de glicerol; E6 - 5 g.L⁻¹ de manitol e 45 g.L⁻¹ de glicerol; E7 - 20 g.L⁻¹ de manitol e 80 g.L⁻¹ de glicerol; E8 - 20 g.L⁻¹ de manitol e 10 g.L⁻¹ de glicerol; E9 - 20 g.L⁻¹ de manitol e 45 g.L⁻¹ de glicerol

No filme E9, por sua vez, foi possível verificar sua plastificação pela porção estirada da membrana no momento do rompimento, visível na foto E9a, mas também foi notável o rompimento da membrana de celulose plastificada pelos cristais que emergiram do interior da trama, destruindo a estrutura da celulose. No filme E8 também foi possível visualizar cristais de manitol emergindo na superfície da celulose, mas em uma proporção consideravelmente menor (E8c). Ambos apresentaram maior permeabilidade do que os filmes E5, E6, e E7, possivelmente devido aos poros ainda presentes, que permitem maior difusão do vapor.

Difratometria de raios-X

A inclusão de cada um dos poliálcoois à trama da celulose influenciou a cristalinidade do polissacarídeo de maneiras diferentes. Na Tabela 4, estão os graus de cristalinidade total (%Ct) calculados para cada filme analisado por dRX e para a celulose pura.

Tabela 4. Ângulo e intensidade dos picos de difração dos planos característicos da celulose I, distância entre os planos e o diâmetro médio dos cristalitos

Amostras:		E5	E6	E7	E8	E9	BC
Manitol (g.L ⁻¹)		35	5	20	20	20	0
Glicerol (g.L ⁻¹)		45	45	80	10	45	0
Planos	Parâmetros						
(1 $\bar{1}$ 0)	Ângulo	-	14,46	-	14,27	14,34	14,50
	Intensidade	-	171,58	-	61,52	118,33	858,80
	D _{hkl} (nm)	-	0,308	-	0,001	0,350	0,341
	d	-	7,89	-	116,72	13,70	12,89
(110)	Ângulo	-	-	-	16,55	-	16,50
	Intensidade	-	-	-	63,34	-	353,63
	D _{hkl} (nm)	-	-	-	0,271	-	0,301
	d	-	-	-	52,48	-	10,54
(200)	Ângulo	22,56	22,44	22,38	22,50	22,54	22,60
	Intensidade	312,56	363,80	221,76	131,80	154,46	1138,60
	D _{hkl} (nm)	0,201	0,202	0,202	0,223	0,222	0,222
	d (Scherrer)	9,46	12,57	4,97	9,68	12,16	13,45
%Cr		53,82	28,07	34,76	35,29	40,31	30,16

Fonte: Dados da pesquisa

Considerando-se que o cálculo do diâmetro médio dos cristalitos (d) é baseado em medidas realizadas manualmente e que, portanto, a exatidão dos valores obtidos não é elevada, apenas as diferenças maiores ou iguais a 10% foram consideradas significativas nesses valores. As diferenças das demais medidas foram consideradas significativas a partir de 5%.

Nos filmes E6, E7 e E8, a medida da intensidade de difração referente ao material amorfo (I_{am}) não apresentou a menor intensidade de difração do difratograma, talvez pela presença de picos de difração não característicos da celulose. Dessa forma, considerando que o perfil dos picos da celulose e do vale entre eles foi interferido, o índice de cristalinidade não foi considerado e o percentual de cristalinidade (%Cr) foi calculado com base na relação entre o somatório das áreas dos picos cristalinos (I_c) e a área do halo amorfo (I_a), como descrito na metodologia (equação 12). Desta maneira, o grau de cristalinidade correspondeu ao somatório das contribuições das regiões cristalinas da celulose, dos cristais de manitol e os que deram origem a novos planos de difração.

O percentual de cristalinidade de todos os filmes foi maior que o da celulose pura, exceção feita ao filme E6. O aumento do percentual de cristalinidade se deu provavelmente pela contribuição da intensidade dos picos de difração dos cristais de manitol, formados em todos os filmes, o que impossibilitou a avaliação da redução das regiões cristalinas da celulose, porém, considerando-se que o percentual de cristalinidade do manitol é 100%, o aumento do grau de cristalinidade dos filmes em relação ao da celulose pura foi pequeno, o que indica a possibilidade de redução da cristalinidade da celulose acompanhada de interação entre manitol e glicerol, reduzindo a formação de cristais do primeiro poliálcool.

No filme E6, a concentração de manitol foi a menor testada e a de glicerol foi nove vezes maior que a de manitol. Nesse filme foi possível verificar a redução do percentual de cristalinidade em relação ao da celulose pura apesar da presença dos cristais deste poliálcool (Figura 44), o que comprova a redução da cristalinidade da celulose que, neste caso, não foi compensada e nem superada pela intensidade de difração dos planos dos cristais de manitol formados.

As combinações de concentrações de cada poliálcool nas misturas utilizadas permitiu a verificação da influência do aumento ou redução da concentração de cada

poliálcool da mistura sobre esses índices. A comparação dos valores obtidos para os filmes E7 e E9, com a mesma concentração de manitol e diferentes concentrações de glicerol, permitiu a verificação de que o aumento da concentração de glicerol reduziu o percentual de cristalinidade, confirmando, portanto, a forte interação do glicerol com as cadeias de celulose, distanciando-as e desorganizando-as, o que reduziu as regiões cristalinas. No filme E8, o percentual de cristalinidade não superou o do E9, apesar de ter sido produzido com proporção glicerol/manitol menor. É possível que parte do manitol adicionado à mistura não tenha permanecido no interior do filme por causa da reduzida quantidade de glicerol disponível para estabilizá-lo, não resultando, portanto, em uma quantidade maior de cristais em seu interior e um percentual de cristalinidade mais elevado do que o do E9.

Comparando-se os dados dos filmes E5, E6 e E9, com mesma concentração de glicerol, mas diferentes de manitol, é possível verificar que o aumento da concentração de manitol na mistura de poliálcoois resultou em percentual de cristalinidade mais elevado. Além de confirmar que os cristais de manitol contribuíram para o aumento do percentual de cristalinidade, é possível que o glicerol se divida entre as interações com a celulose e a dissolução do manitol no interior do filme. Desta forma, o aumento da concentração de manitol deixa menor quantidade de glicerol disponível para a interação com a celulose, reduzindo sua influência sobre as regiões cristalinas da mesma.

A Figura 44 exhibe os difratogramas dos filmes E5, E6, E7, E8 e E9. Os números de picos de reflexão de planos cristalinos de manitol em cada um dos filmes foram, respectivamente, 25, 12, 23, 15 e 11. A ordenação dos filmes de acordo com a proporção de concentração de manitol e de glicerol usada na sua produção foi: E8 (2,0); E5 (0,78), E9 (0,44), E7 (0,25) e E6 (0,11). Os filmes com mais picos de reflexão de planos de manitol não foram os que continham as maiores proporções de manitol.

Os filmes E5 e E7 foram produzidos com as concentrações mais altas de manitol e um excesso de glicerol. O elevado número de picos de difração nesses filmes pode ser explicado pela elevada concentração de glicerol (principalmente no filme E5), utilizada para a sua produção, somada à reduzida proporção manitol/glicerol (principalmente no filme E7). Estes dois fatores permitiram que uma

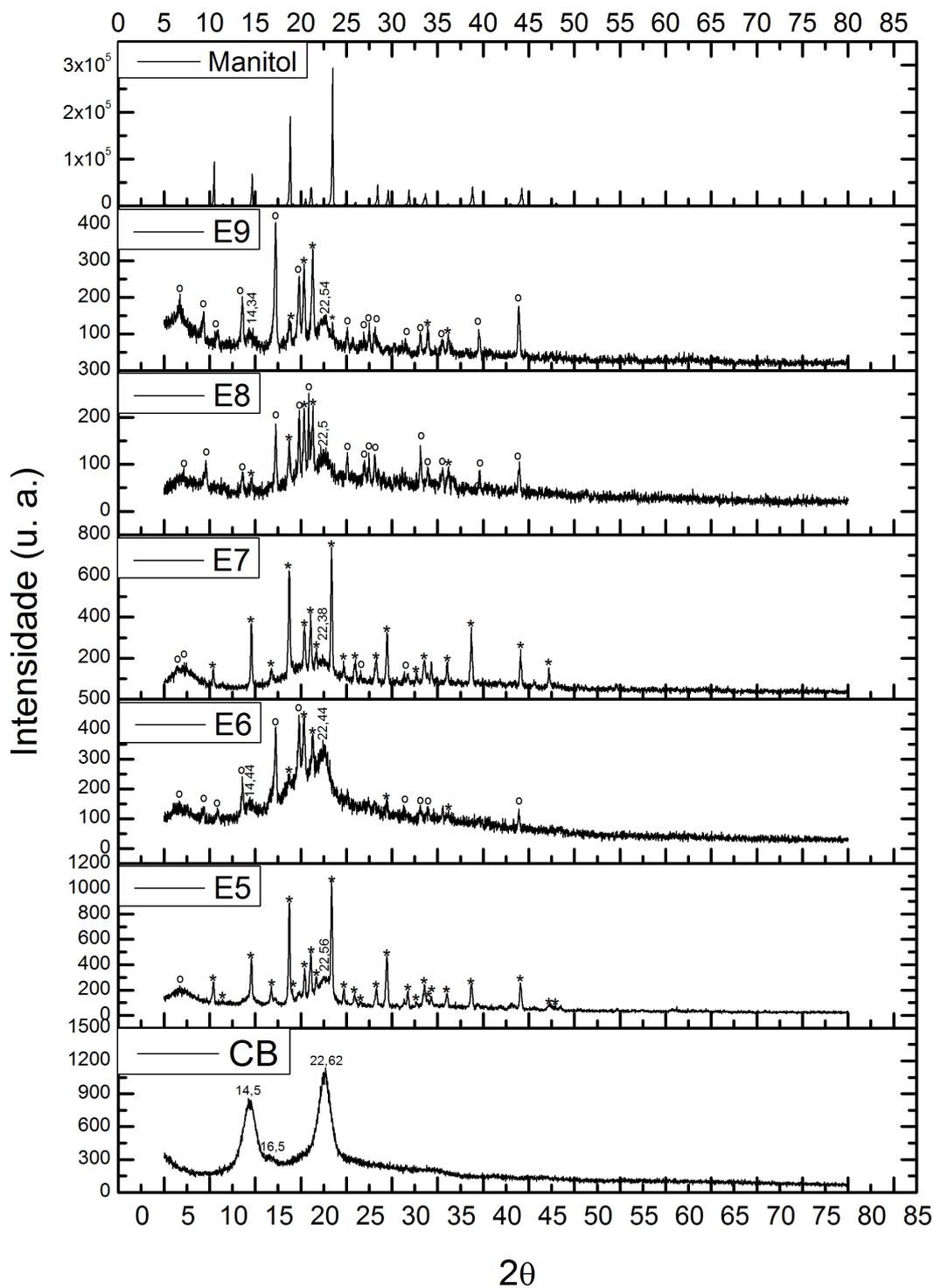
maior quantidade de cristais de manitol se formasse, pois mesmo após a remoção de água do filme, restara ainda quantidade suficiente de solvente (glicerol) para permitir a mobilidade das moléculas de manitol e o afastamento das fitas de celulose, dando espaço para a movimentação e organização das moléculas de manitol em cristais. Tal fato explica também a ausência de muitos picos de difração no difratograma do filme E9, produzido com a mesma concentração de manitol, mas concentração bem menor de glicerol.

O filme E6 foi produzido com a mínima concentração de manitol, que pode ter permanecido, ao menos em grande parte, solvatado no glicerol do filme, o que justifica o reduzido número de picos de difração com intensidade suficiente para sua detecção. Por outro lado, o filme E8, também com reduzido número de picos de cristais de manitol, foi produzido com quantidade relativamente alta deste poliálcool, mas quantidade reduzida de glicerol, o que provavelmente dificultou a formação correta dos cristais de manitol no interior do filme após a secagem. Isto resultou em cristais mal formados (Figura 43 E8C), com rede cristalina diferente da referência, o que se justifica pelo grande número de picos que não correspondem aos característicos do manitol e aparecimento de novos planos de difração.

Dentre os planos característicos da celulose I, somente o (200) foi identificado em todos os filmes, provavelmente por ser o que apresenta maior intensidade na celulose e, apesar de ter sido consideravelmente reduzido em todos os filmes produzidos, apresentou-se parcialmente preservado (Tabela 4).

O filme E8 foi o único em que todos os picos de difração dos planos característicos da celulose I foram preservados, a distância entre os planos foi a menor nos planos $(1 \bar{1} 0)$ e (110) (0,001 e 0,223, respectivamente) do que nos demais filmes analisados, e o tamanho médio dos cristalitos do plano $(1 \bar{1} 0)$ ($d = 116,72$ nm) foi, de longe, a maior em relação ao mesmo plano nos outros filmes e também dos outros planos no mesmo filme.

Figura 43. Difratogramas dos filmes E5, E6, E7, E8 e E9, do manitol e da celulose bacteriana pura



Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: (*) correspondem aos picos de reflexão de planos cristalinos do manitol;
 - picos correspondentes aos da celulose presentes nos difratogramas dos filmes estão destacados com o ângulo de reflexão do plano
 (o) correspondem novos planos de difração formados.

Essas características indicam que as condições de produção desse filme possibilitou preservar preferencialmente esse plano cristalino, possivelmente por ter sido produzido com a menor concentração de glicerol e a maior proporção manitol/glicerol (= 2). Desta feita, confirmou-se que o glicerol é o poliálcool que mais interage com a celulose interferindo na sua organização cristalina, porém o manitol contribui com a preservação da celulose, reduzindo a quantidade de glicerol disponível para a interação com o manitol. No filme E8, é possível que todo o glicerol tenha sido direcionado à interação com o manitol, contribuindo assim para a preservação de todos os planos cristalinos.

Considerando ainda o plano $(1\ \bar{1}\ 0)$, o filme E6 apresentou cristalitos com menor tamanho médio ($d = 7,89\text{ nm}$). Este, inversamente ao filme E8, apresentou a menor proporção manitol/glicerol (0,11) e, conseqüentemente, maior quantidade de glicerol livre para interagir com a fase cristalina do polissacarídeo. É possível que o pico de difração desse plano apenas não tenha sido visualizado no difratograma do filme E5 por ter sido encoberto pelo pico de difração de plano cristalino do manitol a $14,67^\circ$, cuja intensidade foi bastante elevada. Já no filme E7, tal pico provavelmente não pôde ser visualizado devido à elevada concentração de glicerol utilizada em sua produção (80 g.L^{-1}), o que certamente foi responsável pela desorganização da estrutura cristalina que contém esse plano. Este filme também foi o que apresentou o menor tamanho médio dos cristalitos ($d = 4,97\text{ nm}$) que contém o plano (200).

O plano cristalino (110) parece ser o mais susceptível à modificação estrutural, uma vez que só está presente no filme E8. Nesse, a largura média dos cristalitos ($d = 52,48\text{ nm}$) foi bem maior do que na celulose pura ($d = 10,54\text{ nm}$), mas a distância entre os planos ($0,271\text{ nm}$) foi inferior à verificada na membrana de celulose ($0,301\text{ nm}$).

As distâncias entre os planos (200) quase não variou entre as medidas realizadas em todos os filmes e também em relação a celulose pura e os tamanhos médios dos cristalitos que o contém foram todos menores que o da celulose pura.

Nos difratogramas dos filmes não foram encontrados picos de difração correspondentes aos característicos dos planos da celulose II ($11,8^\circ$; 20° e $21,5^\circ$ correspondentes aos planos $(1\ \bar{1}\ 0)$, (110) e (200), respectivamente) (KOLPAK &

BLACKWELL, 1975), o que significa que apesar dos tratamentos recebidos e da considerável interação entre os polióis utilizados na produção dos filmes, não houve mercerização parcial da celulose.

Os dados obtidos nos difratogramas possibilitaram atribuir as modificações de transparência, espessura, intumescimento, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água às alterações nos domínios cristalinos da celulose, em decorrência da associação com poliálcoois. Essa constatação pareceu abrir um horizonte de pesquisa para a produção de filmes comestíveis com celulose bacteriana.

6 CONCLUSÕES

Quanto à influência do uso de diferentes fontes de carbono puras e da velocidade de agitação do meio de cultura na produção de celulose pela bactéria *G. xylinus*, constatou-se que todas as respostas analisadas (produção de celulose, biomassa, acetana produzida, capacidade de retenção de água da celulose, consumo de substrato e Y_{psCB} , Y_{xs} , Y_{ps} (Acetana)) são influenciadas por ambos os fatores independentes testados e que há interação entre tais variáveis no que se refere ao efeito sobre produção de celulose, biomassa e acetana.

A maior produção de celulose é alcançada com a mistura de glicose e frutose, mas o maior fator de conversão de substrato em celulose é obtido pelo uso de glicose, sempre com os cultivos feitos em meio estático, já que a agitação, independente da velocidade, acarreta na redução de produção quando monossacarídeos e dissacarídeos são utilizados como fonte de carbono.

A associação do uso de soluções de NaOH e aquecimento em forno de micro-ondas permite a remoção efetiva de impurezas sem o comprometimento estrutural da celulose I em celulose II, a qual também pode ser obtida pelo uso das mesmas ferramentas, desde que o tempo de 8 min de aquecimento seja superado. Tal modificação estrutural é refletida na espessura das fibras, na capacidade de retenção de água e na cristalinidade da celulose.

Propriedades de filmes comestíveis de celulose, como intumescimento, espessura das fibras, solubilidade, flexibilidade, transparência e permeabilidade ao vapor de água podem ser alteradas pela proporção de poliálcoois. O glicerol foi responsável pela redução da cristalinidade da celulose nos filmes produzidos, enquanto o manitol preservou a cristalinidade da mesma, provavelmente por reduzir a quantidade de glicerol livre para interagir com a celulose. Essa relação entre os poliálcoois aponta a possibilidade de adequar as características dos filmes comestíveis às necessidades de uso, contribuindo para o aumento da utilidade da membrana de celulose.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEMDAR, A.; SAIN, M. Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues – Wheat straw and soy hulls. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1664–1671, 2008.

ALMEIDA, D.M., WOICIECHOWSKI, A.L., WOSIACK, G., PRESTES, R.A., PINHEIRO, L.A., **Revista Polímeros**, v. 23, p. 538-546, 2013.

ATCC- American Type Culture Collection. ATCC Product Sheet *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 23767. Disponível em <www.atcc.org>. Acesso em 20 mar 2011.

AYDIN, A. A.; ILBERG, V. Effect of different polyol-based plasticizers on thermal properties of polyvinyl alcohol:starch blends. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 441–448, 2016.

BAE, S.; SHODA, M. Bacterial Cellulose Production by Fed-Batch Fermentation in Molasses Medium. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 1366-1371, 2004.

BALDWIN, E.A., NISPEROS, M.O., CHEN, X. E HEGERNMAIER, R.D. Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. **Postharvest Biology and Technology**, v. 9, p. 151-63, 1996.

BARBOSA, H.R. ; ASCHERI, DIEGO PALMIRO RAMIREZ ; ASCHERI, J. L. R. ; CARVALHO, C. W. P. Permeabilidade, estabilidade e funcionalidade de filmes biodegradáveis de amido de caroço de jaca (*Artocarpus heterophyllus*). **Revista Agrotecnologia**, v. 2, p. 73-88, 2011.

BARUD, H. S.; REGIANE, T.; BARRIOS, C.; MARQUES, R. F. C.; MOLINA, C.; VERELST, M.; GHYS, J. D.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Membranas de Celulose Bacteriana contendo Nanopartículas de Prata. In: 30º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, **Anais...** São Paulo: SBQ, 2007.

BARUD, H.S. **Novos Materiais Multifuncionais Baseados em Celulose Bacteriana**. 2006. 172 f. Dissertação de Mestrado (programa de pós-graduação em química) Universidade Estadual Paulista, Araraquara- SP, 2006.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; LIMA, D.P. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 306-319, 2011.

BRASIL. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília, DF. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. v. 2. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília, DF. 2010.

BRASIL. Plano Nacional de Agroenergia. **Ministério da Ciência e Tecnologia**. Brasília, DF, 2005.

BROWN JR. R. M. The Biosynthesis of Cellulose. **Journal of Macromolecular Science**, Part A: Pure and Applied Chemistry, v. 33, n. 10, p. 1345-1373, 2006.

BROWN JR., R. M. Cellulose structure and biosynthesis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 5, p. 767-775, 1999.

BUCHERT, J.; NIEMELÄ, K. Oxidative detoxification of wood-derived inhibitors by *Gluconobacter oxydans*. **Journal of Biorechnology**, v. 18, p. 1-12, 1991.

CALLISTER, W; RETHWISCH, D. G. **Fundamentos da ciência e engenharia de materiais**. 4. ed. São Paulo: LTC, 2014.

CAO, .N.; YANG, X.; FU, Y. Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. **Food Hydrocolloids**. v. 23, p. 729-735, 2009.

CASTRO, C.; ZULUAGAB,R.; PUTAUXC, J.; CAROA, G.; MONDRAGON, I.; GAÑÁN, P. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 96–102, 2011.

CENTRALVET. Bioprat. [Acesso em 28 jul 2011] Disponível em <https://sites.google.com/site/catalogocentralvet/produtos-veterinarios/manejo-de-feridas/celulose-bacteriana-pele-artificial>.

CHENG, K.; CATCHMARK, J.M.; DEMIRCI, A. Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis. **Journal of Biological Engineering**, v. 3, n.12, 2009.

CISNEIROS-ZEVALLOS L., KROCHTA J.M. 2002. Whey protein coatings for fresh fruits and relative humidity effects. **Food Engineering and physical properties**.v. 67, p. 190-197.

COLARES-QUEIROS, F.P.;

FAKHOURI, F. M.; FONTES, L. C. B.; GONÇALVES, P. V. M.; MILANEZ, C. R.; STEEL, C. J.; COLLARES-QUEIROZ, F. P. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 369-375, 2007.

COOK, K. E.;COLVIN, J. R. Evidence for a Beneficial Influence of Cellulose Production on Growth of *Acetobacter xylinum* in Liquid Medium. **Current Microbiology**, v. 3, p. 203-205, 1980.

COUSO, R. O.; IELPI, L.; GARCIA, R. C.; DANKERT, M. A. Biosynthesis of Polysaccharides in *Acetobacter xylinum*. Sequential Synthesis of a Heptasaccharide Diphosphate Prenol. **European Journal of Biochemistry**, v. 123, p. 617-627, 1982.

COUSO, R. O.;IELPI, L. DANKERT, M. A. A xanthan-gum-like Polysaccharide from *Acetobacter xylinum*. **Journal of General Microbiology**, v. 133, p. 2123-2135, 1987.

- CZAJA, W., KRYSZYŃCZAK, A., BIELECKI, S., BROWN JR, R. M.. Microbial cellulose-the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, p. 145–151, 2006.
- DONINI, I.A.N., SALVI, D.T.B., FUKUMOTO, F.K, WILTON, R.L., BARUD, L.H., MARCHETTO, R., MESSADDEQ, Y., RIBEIRO, S.J.L. Biosynthesis and recent advances in production of bacterial cellulose. **Revista Eclética Química**, v. 35, p. 165 - 178, 2010.
- FAKHOURI, F. M.; FONTES, L. C. B.; GONÇALVES, P. V. M.; MILANEZ, C. R.; STEEL, C. J.; COLARES-QUEIROS, F. P. Filmes e Coberturas Comestíveis Compostas à Base de Amidos Nativos e Gelatina na Conservação e Aceitação Sensorial de Uvas Crimson. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 369-375, 2006.
- FITZEMAURICE, G. The Meaning and Interpretation of Interaction. **Nutrition**, v. 16, p. 313-314, 2000.
- GALLO, J. A. Q., DEBEAUFORT, F.; CALLEGARIN, F.; VOILLEY, A. Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based edible films. **Journal of Membrane Science**, v. 180, p. 37-46, 2000.
- GAUTAM, S. P.; BUNDELA, P.S.; PANDEY, A.K.; JAMALUDDIN, AWASTHI, M.K.; SARSAIYA, S. A review on systematic study of cellulose. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 2, n 2, p. 330-343, 2010.
- GEA, S.;REYNOLDS, C. T.; ROOHPUR, N.; WIRJOSENTONO, B.; SOYKEABKAEW, N.; BILOTTI, E.; PEIJS, T. Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behavior of bacterial cellulose after a two-step purification process. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9105-9110, 2011.
- GARRITY, G. M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed, v 2. United States of America: Springer. 2005.
- GEORGE, J.; RAMANA, K. V.; SABAPATHY, S. N.; BAWA, A. S. Physico-mechanical properties of chemically treated bacterial (*Acetobacter xylinum*) cellulose membrane. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1323-1327, 2005.
- GILLIS, M.; KERSTERS, K. GOSSELÉ, F.; SWINGS, J.; DE LEY, J.; MacKENZIE, A. R.; BOUSFIELD, I. J. Rediscovery of Bertrand's Sorbose Bacterium (*Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*): Proposal to Designate NCIB 11664 in Place of NCIB 4112 (ATCC 23767) as the Type Strain of *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, p. 122-124, 1983.
- GOELZER, F.D.E., FARIA-TISCHER, P.C.S., Vitorino, J.C., Sierakowski, M. R., Tischer, C.A. Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark. **Materials Science and Engineering C**. v. 29, p. 546–551, 2009.

GONTARD, N. THUBAULT, R. CUB, B. GUILBERT, S. Influence of Relative Humidity and Film Composition on Oxygen and Carbon Dioxide Permeabilities of Edible Films. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 1064-9, 1996.

HESTRIN, S., SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. **Biochemical Journal**, v. 58, p. 345-352, 1954.

HONG, F., QIU, K. An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain *Acetobacter aceti* subsp. *xylinus* ATCC 23770. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 545–549, 2008.

IANNINO, N. I.; COUSO, R. O.; DANKERT, M. A. Lipid-linked Intermediates and the Synthesis of Acetan in *Acetobacter xylinum*. **Journal of General Microbiology**, v. 134, 1731-1736, 1988.

INOUE, H.; BABA, Y.; TSUHAKO, M. Phosphorylation of cellulose with cyclo-triphosphate. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.43, n. 4, p.677-678, 1995.

INOUE, H.; NAKAYAMA, H.; TSUHAKO, M. A one-step phosphorylation of D-aldoheptoses and D-aldopentoses with inorganic cyclo-triphosphate. **Carbohydrate Research**, v. 324, p. 10–16, 2000.

INOUE, H.; TONE, N.; NAKAYAMA, Y.; TSUHAKO, M. Phosphorylation of Disaccharides with Inorganic cyclo-Triphosphate in Aqueous Solution. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 11, p. 1453—1459, 2002.

INOUE, H.; TONE, N.; NAKAYAMA, Y.; TSUHAKO, M. Stereoselective phosphorylation of branched cyclodextrins with inorganic cyclo-triphosphate. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 2067-2074, 2003.

INOUE, H.; WATANABE, M.; NAKAYAMA, H.; TSUHAKO, M. Phosphorylation of D-Glucose Derivatives with Inorganic cyclo- triphosphate: substituent effect at the 5-CH₂OH or 2-OH group. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 48, n. 6, p. 1397—1402, 2000.

ISHIDA, T., SUGANO, Y., NAKAI, T., SHODA, M., 2002a. Effects of Acetan on production of Bacterial Cellulose by *Acetobacter xylinum*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 8, p. 1677-1681, 2002..

ISHIDA, T.; SUGANO, Y.; SHODA, M. Novel glycosyltransferase genes involved in the acetan biosynthesis of *Acetobacter xylinum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 295, p. 230–235, 2002b.

ISHIDA, T.; MITARAI, M.; SUGANO, Y.; SHODA, M. Role of Water-Soluble Polysaccharides in Bacterial Cellulose Production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, p. 474-478, 2002c.

ISHIHARA, M.; MATSUNAGA, M.; HAYASHI, N.; TIŠLER, V. Utilization of d-Xilose as carbon source for production of bacterial cellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 31, p. 986–991, 2002.

JAGANNATH, A.; RAJU, P. S.; BAWA, A. S. Comparative evaluation of bacterial cellulose (nata) as a cryoprotectant and carrier support during the freeze drying process of probiotic lactic acid bacteria. **LWT - Food Science and Technology**, n. 43, p. 1197-1203, 2010.

JANSSON, P.; LINDBERG, J.; WIMALASIRI, K. M. S.; DANKERT, M. A. Structural studies of acetan, an exopolysaccharide elaborated by *Acetobacter xylinum*. **Carbohydrate Research**, n. 245, p. 303-310, 1993.

JUNG, H.; JEONG, J.; LEE, O.; PARK, G.; KIM, K.; PARK, H.; LEE, S.; KIM, Y.; SON, H. Influence of Glycerol on production and structural-physical properties of cellulose from *Acetobacter* sp. V6 cultured in shake flasks. **Bioresource Technology**, n. 101, p. 3602-3608, 2010.

JUNG, H., LEE, O., JEONG, J., JEON, Y., PARK, K., KIM, H., NA, W., SON, H. Production and Characterization of Cellulose by *Acetobacter* sp. V6 Using a Cost-Effective Molasses-Corn Steep Liquor Medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 486-497, 2010.

KADERE, T. T.; MIYAMOTO, T.; ONIANG`O, R. K.; KUTIMA, P. M.; NJOROGE, S. M. Isolation and identification of the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* in coconut toddy (mnazi). **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 16, p. 2963-2971, 2008..

KESHK, S. M. A. S., SAMESHIMA, K. Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n 6, p. 478-482, 2005.

KLECHKOVSKAYA, V. V.; BAKLAGINA, YU. G.; STEPINA, N. D.; KHRIPUNOV, A. K.; BUFFAT, P. A.; SUVOROVA, E. I.; ZANAVESKINA, I. S.; TKACHENKO, A. A.; GLADCHENKO, S. V. Structure of Cellulose *Acetobacter xylinum*. **Crystallography Reports**, v. 48, n. 5, p. 755-762, 2003.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial synthesised cellulose – artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v. 26, p. 1561-1603, 2001.

KONGRUANG, S. Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* Strains from Agricultural Waste Products. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 148, p. 245-256, 2008.

KORNMANN, H., DUBOC, P., MARISON, I., STOCKAR, U. Influence of Nutritional Factors on the Nature, Yield, and Composition of Exopolysaccharides Produced by *Glucoacetobacter xylinus* I-2281. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 6091-6098, 2003.

KUROSUMI, A., SASAKI, C., YAMASHITA, Y., NAKAMURA, Y. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. **Carbohydrate Polymers**. v. 76, p. 333-335, 2009.

LABUZA, T. E BREENE, W. Application of active packaging for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 13, p. 81-89, 1989.

LAMIM, R. **Quitosana e N-carboximetilquitosana: desenvolvimento de biofilmes para aplicações farmacêuticas**. 2006. 80 f. Dissertação de Mestrado (Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas), Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí-SC, Brasil.

LAMIM, R.; FREITAS, R. A.; RUDEK, E. I.; WILHELM, H. M.; CAVALCANTI, O. A.; BRESOLIN, T. M. B. Films of chitosan and N-carboxymethylchitosan. Part II: Effect of plasticizers on their physicochemical properties. **Polymer International**, v. 55, p. 970–977, 2006.

LEE, K.; BULDUM, G.; MANTALARIS, A.; BISMARCK, A. More Than Meets the Eye in Bacterial Cellulose: Biosynthesis, Bioprocessing, and Applications in Advanced Fiber Composites. **Macromolecular Bioscience**, v. 14, p. 10–32, 2014.

LEE, K.; TAMMELIN, T.; SCHULFTER, K.; KIISKINEN, H.; SAMELA, J.; BISMARCK, A. High Performance Cellulose Nanocomposites: Comparing the Reinforcing Ability of Bacterial Cellulose and Nanofibrillated Cellulose. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 4, p. 4078–4086, 2012.

LI, Q.; RENNECKAR, S. Supramolecular structure characterization of molecularly thin cellulose I nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 650-659, 2011.

LIN, S.B., HSU, C.P., CHEN, L.C., CHEN, H.H., 2009. Adding enzymatically modified gelatin to enhance the rehydration abilities of bacterial cellulose. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2195–2203.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. BIODIESEL: PARÂMETROS DE QUALIDADE E MÉTODOS ANALÍTICOS. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.

MAFFEI, H.V.L. Dietary fiber and constipation. **Jornal de Pediatria**, v. 80, p. 527-529, 2004.

MASON T.J. Microwave and ultrasonic processing: Now a realistic option for industry. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**; (2010)

MATTA JUNIOR, M. D., SARMENTO, S.B.S., SARANTÓUPOLOS, C.I.G.L., ZOCCHI, S.S. Propriedades de Barreira e Solubilidade de Filmes de Amido de Ervilha Associado com Goma Xantana e Glicerol. **Revista Polímeros**, v. 21, p. 67-72, 2011.

MCNAMARA, J. T.; MORGAN, J. L. W.; ZIMMER, J. 2015. A Molecular Description of Cellulose Biosynthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, p. 895–92.

MENÉNDEZ JA, ARENILLAS A, FIDALGO B, FERNÁNDEZ Y. ZUBIZARRETA L, CALVO EG, MIKKELSEN, D. FLANAGAN, B. M., DYKES, G. A., GIDLEY, M. J.,

2009. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 576-583.

MENÉNDEZ, J. A.; ARENILLAS, A.; FIDALGO, B.; FERNÁNDEZ, Y.; ZUBIZARRETA, L.; CALVO, E. G.; BERMÚDEZ, J. M. Microwave heating processes involving carbon materials. **Fuel Processing Technology**, v. 91, p. 1–8, 2010.

MU, C., GUO, J., LI, X., LIN, W., LI, D. Preparation and properties of dialdehyde carboxymethyl cellulose crosslinked gelatin edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 22-29, 2012.

NARITOMI, T., KOUDA, T., YANO, H., YOSHINAGA, F.. Effect of Ethanol on Bacterial Cellulose Production in Continuous Culture. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, n. 6, p. 598-603, 1998a.

NARITOMI, T., KOUDA, T., YANO, H., YOSHINAGA, F.. Effect of Lactate on Bacterial Cellulose Production from Fructose in Continuous Culture. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 85, n. 1, p. 89-95, 1998b.

NARITOMI, T.; KOUDA, T.; YANO, H.; YOSHINAGA, F.; SHIGEMATSU, T.; MORIMURA, S.; KIDA, K. Influence of broth exchange ratio on bacterial cellulose production by repeated-batch culture. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 41-47, 2002.

NGUYEN, V. T.; FLANAGAN, B.; MIKKELSEN D.; RAMIREZ, S.; RIVAS, L.; GIDLEY, M. J.; DYKES, G. A. Spontaneous mutation results in lower cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 337–343, 2010.

NORO, N., SUGANO, Y., SHODA, M.. Utilization of the buffering capacity of corn steep liquor in bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 64, p. 199–205, 2004.

OLIVEIRA, P.S.M, FERREIRA V.F. SOUZA, M.V.N. Utilização do D-manitol em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 32, p. 441-452, 2009.

OJINNAKA, C.; JAY, A.J.; COLQUHOUN, I.J.; BROWNSEY, G.J.; MORRIS, E.R.1996. Structure and conformation of acetan polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 19, p. 149-156.

PALMQVIST, E., GRAGE, H, MEINANDER, N. Q., HAHN-HÄGERDAL, B.. Main and Interaction Effects of Acetic Acid, Furfural, and p-Hydroxybenzoic Acid on Growth and Ethanol Productivity of Yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, n. 1, p. 46-55, 1999.

PERTILE R. A. N. Interação de culturas celulares com suportes biopoliméricos para aplicações biomédicas. **Exacta**, v. 5, p.342-352, 2007.

ROCHA, G. O., FARIAS, M.G., CARVALHO, C.W.P., ASCHERI, J.L.R., GALDEANO, M.C., **Polímeros**, v. 24, p. 587-595, 2014.

RODRIGUES, D.C., **Influência de amido de mandioca e cera de carnaúba sobre as propriedades físicas de filme à base de goma de cajueiro**. 2012. 90 f. Dissertação de Mestrado (programa de pós-graduação em Engenharia Química), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2012. ‘

RÖMLING, U. Molecular biology of cellulose production in bacteria. **Research in Microbiology**, v. 153, p. 205–212, 2002.

ROSS, P., MAYER, R., BENZIMAN, M., 1991. Cellulose Biosynthesis and function in bactéria. **Microbiological Reviews**, v. 55, p. 35-58.

RUKA, D. R.; SIMON, G. P.; DEAN, K. M. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**. v. 89, p. 613-622, 2012.

SAHA, B.C. RACINE, F.M. Biotechnological production of mannitol and its applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 879-891, 2011.

SAHA, B.C. RACINE, F.M. Biotechnological production of mannitol and its applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 879-891, 2011.

SAIN, M. PANTHAPULAKKAL, S. Bioprocess preparation of wheat straw fibers and their characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 23, p. 1–8, 2006.

SAKAIRI, N.;ASANO, H. OGAWA, M.; NISHI, N.; TOKURA, S. 1998. A method for direct harvest of bacterial cellulose filaments during continuous cultivation of *Acetobacter xylinum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 35, p. 233-237.

SANTOS, D. M.; BUKZEM, A. L.; ASCHERI, D. P. R.; SIGNINI, R.; AQUINO, G. L. B. 2015. Microwave-assisted carboxymethylation of cellulose extracted from brewer's spent grain. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 125–133.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, p. 19-27.

SASKA, S.; BARUD, H. S.; GASPAR, A. M. M.; MARCHETTO, R.; RIBEIRO, S. J. L.; MESSADDEQ, Y. Bacterial Cellulose-Hydroxyapatite Nanocomposites for Bone Regeneration. **International Journal of Biomaterials**. p. 2-8, 2011.

SAXENA, I. M.; BROWN JR, R. M. Biosynthesis of cellulose. **Molecular Breeding of Woody Plants**, p. 69-76, 2001.

SCHMID, J.; SIEBER, V.; REHM, B. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-24, 2015.

SCHRAMM, M., & HESTRIN, S. Factors affecting Production of Cellulose at the Air/Liquid Interface of a Culture of *Acetobacter xylinum*. **Journal of general microbiology**, v. 11, p. 123-129, 1954.

SEMINO, C. E.; DANKE, M. A. In vitro biosynthesis of acetan using electroporated *Acetobacter xylinum* cells as enzyme preparations. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 2745-2756, 1993.

SETYAWATI, M. I.; CHIEN, L.; LEE, C. Expressing *Vitreoscilla* hemoglobin in statically cultured *Acetobacter xylinum* with reduced O₂ tension maximizes bacterial cellulose pellicle production. **Journal of Biotechnology**, v. 132, p. 38–43, 2007.

SHEN, W.; CHEN, S.; SHI, S.; LI, X.; ZHANG, X.; HU, W.; WANG, H. Adsorption of Cu(II) and Pb(II) onto diethylenetriamine-bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 110–114, 2009.

SHEZAD, O., KHAN, S., KHAN, T., PARK, J. K.. Production of bacterial cellulose in static conditions by a simple fed-batch cultivation strategy. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 26, n. 6, p. 1689-1692, 2009.

SHEZAD, O., KHANA, S., KHAN, T., PARK, J. K.. Physicochemical and mechanical characterization of bacterial cellulose produced with an excellent productivity in static conditions using a simple fed-batch cultivation strategy. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 173–180, 2010.

SHIMAZU, MALI, GROSSMANN. Efeitos Plastificantes e Antiplastificante do Glicerol e do Sorbitol em Filmes Biodegradáveis de Amido de Mandioca. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 28, p. 79-88, 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SINGH, S.; FETT, W. F. Stimulation of exopolysaccharide production by fluorescent *Pseudomonas* in sucrose media due to dehydration and increased osmolarity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 130, p. 301-306, 1995.

SKERMAN, V. B. D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P. H. A. Approved Lists of Bacterial Names. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 30, p. 225-420, 1980.

SOBRAL, P.J.A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 1251-1259, 2000.

SON, H.; KIM, H.; KIM, K.; KIM, H.; KIM, Y.; LEE, S. Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 215–219, 2003.

SUGANO, N. N. Y.; SHODA, M. Utilization of the buffering capacity of corn steep liquor in bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 199–205, 2004.

- SVENSSON, A., NICKLASSON, E., HARRAH, T., PANILAITIS, B., KAPLAN, D. L., BRITTBERG, M., GATENHOLM, P.. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*. 26, 419–431.
- TODA, K., ASAKURA, T., FUKAYA, M., ENTANI, E., KAWAMURA, Y., 1997. Cellulose Production by Acetic Acid-Resistant *Acetobacter xylinum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 3, p. 228-231, 2005.
- TOMITA, Y.; KONDO, T. Influential factors to enhance the moving rate of *Acetobacter xylinum* due to its nanofiber secretion on oriented templates. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 754–759, 2009.
- TSUAAKO, M.; SUEYOSHI, C.; BABA, Y.; MIYAJIMA, T.; OHASHI, S.; NARIAI, H.; MOTOOKA, I. 1987. Phosphorylation of Glucose with cyclo-Triphosphate. **Chemistry Letters**, p. 1431-1434,1987.
- VALLA, S.; KJOSBAKKEN, J. Isolation and characterization of a new extracellular polysaccharide from a cellulose-negative strain of *Acetobacter xylinum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 599-603, 1981.
- VERSCHUREN, P. G.; CARDONA, T. D.; NOUT, Z. M. J. R.; GOOIJER, K. D.; VAN DEN HEUVEL, J. C. Location and Limitation of Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* Established from Oxygen Profiles. *Journal OF Bioscience and Bioengineering*. Vol. 89, No. 5, 414-419. 2000.
- VIGANTS, A.; ZIKMANIS, P.; BEKERS, M. Sucrose medium osmolality as a regulator of anabolic and catabolic parameters in *Zymomonas* culture. **Acta Biotechnologica**, v. 16, p. 321-327, 1996.
- WAN, Y.Z.; HONG, L.; JIA, S.R.; HUANG, Y.; ZHU, Y.; WANG, Y.L.; JIANG, H.J. Synthesis and characterization of hydroxyapatite–bacterial cellulose nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v. 66, p. 1825–1832, 2006.
- WANG, Y.; LUO, Q.; PENG, B.; PEI, C. A novel thermotropic liquid crystalline – Benzoylated bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 875–879, 2008.
- WISSELINK, H.W.; WEUSTHUIS, R.A.; EGGINK, G.; HUGENHOLTZ, J. GROBBEN, G.J. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. **International Dairy Journal**, v. 12, p.151-161, 2002.
- WU Y.; YU S.; MI F.; WU C ; SHYU S; PENG C; CHAO A. Preparation and characterization on mechanical and antibacterial properties of chitosan/cellulose blends. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 435-440, 2004.
- WU, J.; ZHENG, Y. YANG, Z. CUL, Q.; WANG, Q. GAO, S.; DING, X. Chemical modification and characteristic changes in bacterial cellulose treated with different media. **Journal of polymer Research**. v. 18, p. 9945, 2012.

WU, S., LIA, Y. Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, p. 103–108, 2008.

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. The Phylogeny of Acetic Acid Bacteria Based on the Partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, n. 8, p.1244-1251, 1997.

YANG, Y. K., PARK, S. H., HWANG, Z. J. W, PYUN, Y. R., KIM, Y. S. Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* BRC5 under Agitated Condition. **Journal of Fermentation And Bioengineering**, v. 85, n. 3, p. 312-317, 1998.

ZHANG, S.; WINESTRAND, S.; CHEN, L.; LI, D.; JÖNSSON, L. J.; HONG, F. Tolerance of the Nanocellulose-Producing Bacterium *Gluconacetobacter xylinus* to Lignocellulose-Derived Acids and Aldehydes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 9792–9799, 2014 b.

ZHANG, S.; WINESTRAND, S.; GUO, X.; CHEN, L.; HONG, F.; JÖNSSON, L. F. Effects of aromatic compounds on the production of bacterial nanocellulose by *Gluconacetobacter xylinus*. **Microbial Cell Factories**, v. 13, p. 62, 2014a.

ZHONG, C.; ZHANG, G.; LIU, M.; ZHENG, X.; HANP.; JIA, S. Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 97, p. 6189–6199, 2013.